



**Marisa Filipa Duarte Cardoso**

Licenciada em Biotecnologia

**O papel da *Progesterone Receptor  
Membrane Component 1* no metabolismo  
de fármacos mediado por Citocromo P450**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Bioquímica

Orientador:

Francisco Esteves, Doutor, NMS-UNL

Co-orientador:

Michel Kranendonk, Doutor, NMS-UNL



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

**Março, 2019**



**Marisa Filipa Duarte Cardoso**  
Licenciada em Biotecnologia

**O papel da *Progesterone Receptor Membrane Component 1* no metabolismo de fármacos mediado por Citocromo P450**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Mestrado em  
Bioquímica

Orientador:  
Doutor Francisco Esteves, NMS-UNL

Coorientador:  
Doutor Michel Kranendonk, NMS-UNL



**O papel da *Progesterone Receptor Membrane Component 1* no metabolismo de fármacos mediado por Citocromo P450**

Copyright © Marisa Filipa Duarte Cardoso, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

**2019**



**Esta tese contém dados e/ou metodologias apresentados nas seguintes comunicações ou encontros científicos:**

**Apresentação de Poster:**

Cardoso M., Esteves F., Kranendonk M. (2018), Initial findings suggest a stimulatory role of Progesterone Receptor Membrane Component 1 (PGRMC1) in Cytochrome P450 (CYP)-mediated metabolism, 2nd NMS Symposium on Chronic Diseases and Translational Science 2018, CEDOC, Lisboa, 18-19 Out.

Cardoso M., Esteves F., Kranendonk M. (2018), The role of Progesterone Receptor Membrane Component 1 (PGRMC1) in cytochromes P450 (CYP)-mediated Xenobiotic metabolism, NOVAhealth IV Genetics Workshop, Reitoria da Universidade NOVA de Lisboa, Lisboa, 21 Mar (Prémio 1<sup>st</sup> Poster Award).





## AGRADECIMENTOS

Após este ano intenso, o que consigo expressar é que foi um ano de aprendizagem intensa, não só na área científica, mas como também a nível pessoal. Fazer a dissertação teve um impacto enorme em mim e foi, com certeza, tempos de mudança, profissional e emocional. Deste modo, gostaria de refletir sobre as pessoas que me apoiaram e me ajudaram ao longo deste percurso.

Em primeiro lugar, quero mostrar a mais profunda gratidão aos meus orientadores, ao Doutor Francisco Esteves e ao Doutor Michel Kranendonk, por todo o apoio ao longo deste processo e por todos os ensinamentos. Ao professor José Rueff por me receber no centro de Toxigenómica e Saúde Humana, pelo interesse, preocupação, cavalheirismo e pelas palavras, sempre sábias e modestas.

A todos os colegas de laboratório, muito obrigado por todo o apoio e por estarem sempre prontos para me ajudar, não só profissionalmente, mas como também emocionalmente. Ao Bruno Gomes, por ser um anjo da guarda de todos, pela preocupação e bondade genuínas, sempre que precisei sabia que podia recorrer à tua sabedoria. Aos meninos do 2.12, Mónica, Maria João e Miguel, são sem dúvida grande parte da alegria do laboratório, obrigado pelo apoio e gargalhadas. Ao resto do laboratório, que tornaram os dias muito mais leves e que ao mesmo tempo sempre se disponibilizaram um ombro amigo quando necessária, obrigada Susana Catana, Diana Campelo, Bernardo Palma, Dona Lucrécia, Bruno Gomes e Juliana Moraes.

Um especial agradecimento ao Doutor Francisco Esteves, que além de orientador foi uma peça fundamental nesta dissertação, sem ele não teria chegado tão longe. Todos os conselhos, a paciência e companheirismo serão relembrados com muito carinho e, muito do que aprendi, devo à tua orientação. Obrigada pelas risadas e pelas nostalgias musicais, sem dúvida saio culturalmente mais rica. May the force be with you!

Um agradecimento com muito carinho aos meus amigos. Aos que já faziam parte da minha existência e a todos os que passaram a fazer parte. Não consigo enumerar todos, mas muito obrigado pela amizade e paciência, mesmo distantes sei que posso contar sempre convosco e por isso, faço questão de vos transmitir o meu eterno obrigado. Um especial agradecimento à Family Santos, pelo fortalecimento da nossa amizade, por estarmos sempre a um passinho uma da outra, pelas sextas à noite, pelas confissões e pelo amor, muito obrigado por todo o apoio e palavra amiga. À Rita Lourenço, por me ter estendido a mão quando precisei, por ser uma companheira de guerra, muito obrigado pelos teus conselhos e conversas doidas. Ao David Pinto, por ser o tropa mais doido que conheço, contigo há sempre espaço para a gargalhada e comida, mesmo em dias cinzentos. Sem a vossa amizade a minha vida não teria tanta cor e significado.

Por último, expresso a mais profunda gratidão à minha família por proporcionarem um apoio incansável e encorajamento contínuo ao longo dos meus anos de estudo. Esta conquista não seria possível sem eles. Agradeço especialmente à minha mãe, por todos os almoços, recados e, mesmo ignorando o que digo a maioria das vezes, tem uma paciência infinita para os meus dramas. Ao meu pai, por ser sempre o meu herói. Graças a vocês os dois, hoje posso voar mais alto e fazer o que sonhei. Ao meu irmão, um especial obrigado pelo amor incondicional, sei que nem sempre é fácil para ti, mas caminhamos juntos. À minha avó, por me mostrar que devemos sempre evoluir e que família é família. Ao Rúben, por todo o amor, carinho e maluqueira ao longo deste tempo que estamos juntos, sem ti nada disto seria possível. Além de companheiro és amigo e juntos sonhamos e voamos mais alto. OBRIGADO.

Um sincero obrigado a todos por tornarem possível este momento!



## RESUMO

A PGRMC1 (do inglês: *Progesterone Receptor Membrane Component 1*) é uma proteína heme multifuncional com um domínio estruturalmente idêntico ao citocromo *b*<sub>5</sub> (CYB5). É uma proteína altamente conservada e amplamente distribuída entre organismos eucarióticos, localizada maioritariamente no retículo endoplasmático. Em mamíferos, é predominantemente expressa no fígado e rins, mas também se localiza noutros tecidos. É sobre expressa em tumores mamários e de ovário, resistentes à quimioterapia e tem surgido como um potencial biomarcador para a resistência a fármacos. Alguns estudos indicam que a PGRMC1 consegue interagir com o complexo enzimático do citocromo P450 (CYP), levantando a hipótese de que tem a capacidade de interferir no metabolismo de fármacos, de um modo semelhante ao CYB5.

Os CYPs são hemoproteínas, localizadas no retículo endoplasmático, envolvidas na maior parte das reações de metabolização, representando cerca de 70% da metabolização de fármacos prescritos. A sua atividade é exclusivamente sustentada pela NADPH-oxidoreductase dos citocromos P450 (CPR), com um papel estimulador opcional pelo citocromo *b*<sub>5</sub>.

Assim, esta dissertação teve como objetivo avaliar a interação da PGRMC1 com o complexo enzimático do CYP e o seu impacto no metabolismo mediado pelos CYPs. Para este fim, utilizou-se um modelo bacteriano biplasmídico que permite a co-expressão do complexo enzimático de CYP e, opcionalmente, da PGRMC1. Selecionou-se três isoformas de CYPs representativas do metabolismo de fármacos (CYP1A2, 2A6 e 3A4). Os resultados indicam interação entre a PGRMC1 e o complexo enzimático de CYP, que provoca um efeito inibitório ou estimulatório da atividade de CYP, conforme a conformação proteica da PGRMC1. Ainda, observou-se um efeito competitivo entre a PGRMC1 e o CYB5, sugerindo que competem para o mesmo local de ligação ao CYP e que existem diferentes sensibilidades do CYP para a PGRMC1, tal como ocorre com o CYB5. Também, foi possível observar que a CPR tem a capacidade de reduzir a PGRMC1, o que suporta a hipótese da CPR ser dadora natural de eletrões da PGRMC1.

**PALAVRAS-CHAVE:** PGRMC1, Citocromo P450, NADPH-oxidoreductase dos citocromos P450, Citocromo *b*<sub>5</sub>, quimioresistência.



## ABSTRACT

Progesterone Receptor Membrane Component 1 (PGRMC1) is a multifunctional cytochrome *b*<sub>5</sub> (CYB5)-like heme protein. It's a highly conserved protein widely distributed among eukaryotic organisms and localized mostly in the endoplasmic reticulum. In mammals, it's predominantly expressed in liver and kidney, but is found in other tissues. Overexpression had been found in chemotherapy resistant breast and ovarian cancers and has emerged as a potential biomarker for drug-resistance. Some studies evidenced that PGRMC1 interacts with cytochrome P450 (CYP) enzyme complex, interfering with drug metabolism, in a CYB5-like manner.

CYPs are heme proteins, located in endoplasmic reticulum and are involved in the metabolization of approximately 70% of prescribed drugs. CYPs are exclusively sustain in their activity by NADPH-cytochrome P450 reductase (CPR), with an optional stimulating role by CYB5.

Thus, this dissertation aims to evaluate the interaction of PGRMC1 with the CYP enzymatic complex and its impact on CYP-mediated metabolism. For this purpose, a specialized bi-plasmid bacterial system was used, allowing co-expression of CYP enzymatic complex and, optionally, PGRMC1. Three CYP isoforms were selected: CYP1A2, 2A6 and 3A4, representative of drug-metabolism. Results confirmed the interaction between PGRMC1 and CYP enzyme complex, which causes an inhibitory or stimulatory effect of CYP activity, depending on PGRMC1 protein conformation. Furthermore, a competitive effect was observed between PGRMC1 and CYB5, suggesting competition for the same CYP-binding site and there are different affinities of CYP to PGRMC1, as occurs with CYB5. Also, it was observed that CPR has the putative capacity to reduce PGRMC1, resulting in the possibility of CPR being a natural donor of PGRMC1.

**KEYWORDS:** Progesterone Receptor Membrane Component 1, Cytochrome P450, NADPH-cytochrome P450 reductase, Cytochrome *b*<sub>5</sub>, chemotherapy resistance.



## ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Aspectos gerais do metabolismo de xenobióticos.....	3
1.2. Citocromo P450 (CYP).....	3
1.2.1. O ciclo catalítico.....	5
1.2.2. Isoformas e variantes genéticas do citocromo P450.....	6
1.3. NADPH-oxidoreductase do citocromo P450 (CPR).....	7
1.4. Citocromo <i>b</i> <sub>5</sub> (CYB5).....	10
1.5. <i>Progesterone Receptor Membrane Component 1</i> (PGRMC1).....	11
1.5.1. PGRMC1 e o cancro.....	14
1.5.2. Funcionalidade da PGRMC1.....	15
1.6. Interações citocromo P450:PGRMC1.....	15
1.6. Objetivo do trabalho prático.....	16
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
2.1. MATERIAIS.....	21
2.2. MÉTODOS.....	25
2.2.1. Preparação de células competentes.....	25
2.2.1.1. Preparação de células competentes para eletroporação.....	25
2.2.1.2. Preparação de células competentes para transformação química.....	25
2.2.2. Construção da estirpe DH5 $\alpha$ /pCW_hPGRMC1.....	25
2.2.3. Construção das estirpes BTC-CYP/PGRMC1.....	26
2.2.3.1. Transformação por eletroporação.....	26
2.2.3.2. Eletroforese em gel de agarose.....	26
2.2.3.3. Verificação das características fenotípicas.....	27
2.2.4. Culturas bacterianas das estirpes de <i>E. coli</i> com indução da expressão heteróloga.....	27
2.2.4.1. Expressão das estirpes BTC-CYP e BTC-CYP/PGRMC1.....	27
2.2.4.2. Expressão de PGRMC1.....	27
2.2.5. Estudo das frações membranares.....	27
2.2.5.1. Preparação das frações membranares e sua caracterização.....	27
2.2.5.2. Determinação da concentração de proteína total.....	28
2.2.5.3. Determinação da concentração de citocromo P450.....	28
2.2.5.4. Determinação da concentração de CPR pelo ensaio do citocromo <i>c</i> .....	29
2.2.6. Purificação de PGRMC1.....	29
2.2.7. Imunodeteção de PGRMC1 expressa nas estirpes em estudo.....	29
2.2.8. Avaliação da atividade catalítica dos CYPs.....	30
2.2.8.1. Estudo da integração da PGRMC1 em membranas BTC-CYP.....	30
2.2.8.2. Efeito da PGRMC1 em membranas BTC-CYP.....	30
2.2.8.3. Ensaio de competição entre PGRMC1 e CYB5.....	31
2.2.9. Ensaio de redução da PGRMC1 pela CPR.....	31

3. RESULTADOS .....	33
3.1. Construção das estirpes BTC-CYP/PGRMC1 .....	35
3.1.1. Verificação das características fenotípicas .....	35
3.1.2. Análise do DNA plasmídico.....	35
3.2. Análise preliminar .....	36
3.3. Caracterização das frações membranares e determinação dos conteúdos proteicos .....	37
3.4. Isolamento e análise das frações purificadas de PGRMC1 .....	39
3.5. Avaliação do efeito da PGRMC1 na atividade do complexo CYP .....	40
3.5.1. Estudo da integração da PGRMC1 em membranas BTC-CYP .....	40
3.5.2. Efeito da PRGMC1 na atividade dos CYPs em membranas BTC-CYP.....	41
3.5.3. Ensaio de competição entre a PGRMC1 e o CYB5 .....	42
3.6. Ensaio de redução da PGRMC1 pela CPR.....	46
4. DISCUSSÃO .....	49
4.1. Considerações gerais .....	51
4.2. Avaliação dos resultados preliminares.....	52
4.3. Avaliação do efeito da PGRMC1 no complexo CYP .....	52
4.4. Redução da PGRMC1 pela CPR.....	55
5. CONCLUSÃO .....	57
6. BIBLIOGRAFIA .....	57
ANEXOS .....	57



## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1: Classificação dos citocromos P450 humanos, de acordo com o tipo de substrato que metabolizam (adaptado de Guengerich <i>et al.</i> , 2015) .....	5
Tabela 2.1.1: Lista de reagentes utilizados no trabalho experimental e respetivas marcas .....	21
Tabela 2.1.2: Equipamentos utilizados nos vários procedimentos experimentais.....	22
Tabela 2.1.3: Soluções, meios de cultura e sua composição por litro. ....	23
Tabela 2.1.4: Características das estirpes BTC e DH5 $\alpha$ de <i>E. coli</i> e caracterização dos plasmídeos ao nível de marcadores genéticos .....	24
Tabela 3.1: Parâmetros cinéticos das atividades das diferentes formas de CYP .....	36
Tabela 3.2: Conteúdos das frações membranares, relativamente ao CYP e CPR e respetivo rácio (CPR:CYP).....	38



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.1:</b> Ciclo catalítico dos citocromos P450 (CPR: NADPH-oxidoreductase do citocromo P450; RH: Substrato; ROH: Produto; CYB5: citocromo <i>b</i> <sub>5</sub> ) (adaptado de Guengerich, 2007) .....	6
<b>Figura 1.2:</b> Visão geral das vias metabólicas em que a CPR está envolvida. (Legenda: CPR- NADPH-oxidoreductase do citocromo P450, CYB5- Citocromo <i>b</i> <sub>5</sub> , HO-1 e HO-2: Hemexigenase 1 e 2) (Pandey e Flück 2013).....	8
<b>Figura 1.3:</b> Modelo do equilíbrio conformacional da CPR. Representação da proteína ligada à membrana pela região N-terminal hidrofóbico. À direita, representação da conformação fechada, apropriada para a transferência de elétrons entre flavinas. À esquerda, representação da conformação aberta, com o domínio FMN exposto, indicado para transferência de elétrons para o CYP. a- FAD, b- domínio de ligação ( <i>linker domain</i> ), c- FMN; d- domínio NADPH (adaptado de Ellis et al., 2009). ....	8
<b>Figura 1.4:</b> Modelo representativo do processo de transferência de elétrons provenientes da CPR para o CYP (adaptado Pandey and Sproll, 2014).....	9
<b>Figura 1.5:</b> Estrutura tridimensional da PGRMC1 humana, com representação do grupo heme (cinzento) (PDB ID: 4X8Y). ....	12
<b>Figura 1.6:</b> Visão geral dos dados de expressão de RNA e de proteína gerados no projeto <i>Human Protein Atlas</i> . Os tecidos analisados são divididos em grupos codificados por cores, de acordo com as características funcionais que têm em comum. ( <i>Protein Atlas</i> : ENSG00000101856-PGRMC1).....	13
<b>Figura 1.7:</b> Esquema com as funções putativas da PGRMC1 em diferentes vias metabólicas (adaptado de Cahill <i>et al.</i> , 2016). ....	13
<b>Figura 1.8:</b> Modelo transitório da regulação da estrutura da PGRMC1 em resposta ao grupo heme e ao monóxido de carbono (adaptado de Kabe <i>et al.</i> , 2016).....	15
<b>Figura 3.2:</b> Análise eletroforética em gel de agarose 0.8%. As amostras de DNA plasmídico pertencem a diferentes colônias transformantes de BTC1A2_PGRMC1. (1-4: pCWh1A2 + pLCM_hPGRMC1/POR; 5: pCWh1A2 (controlo); 6: pLCM_hPGRMC1 (controlo); M: Marcador HypperLadder I).....	36
<b>Figura 3.1:</b> Eficiência normalizada expressa como $k_{cat}/K_m$ , comparando as isoformas de CYP quando sustentada por CPR na presença de PGRMC1.....	37
<b>Figura 3.3:</b> Espectro diferencial do CYP1A2 nos comprimentos de onda entre 400 e 500nm (CYP reduzido complexado com monóxido de carbono vs CYP reduzido) na estirpe BTC1A2_PGRMC1..	37
<b>Figura 3.4:</b> Fotografia da membrana de imunodeteção de PGRMC1 nas frações membranares isoladas a partir de culturas induzidas das estirpes BTC-CYP_PGRMC1/CPR. (1: 100 ng de PGRMC1 purificada de origem comercial (padrão); 2: 125 ng de PGRMC1 purificada de origem comercial (padrão); 3: fração membranares da estirpe BTC1A2_PGRMC1/POR; 4: fração membranares da estirpe BTC2A6_PGRMC1/POR; 5: fração membranares da estirpe BTC3A4_PGRMC1/POR; 6: fração membranares de PGRMC1; 7: Fração membranares da estirpe BTC° (controlo); M: Marcador PageRuller 26616) .....	38
<b>Figura 3.5:</b> Figura da membrana de imunodeteção da PGRMC1 com as frações purificadas de PGRMC1. (1: 100 ng de PGRMC1 purificada de origem comercial (padrão); 2: 125 ng de PGRMC1 purificada de origem comercial (padrão); 3: fração purificada F4; 4: BTC° (controlo); 5: fração purificada B3; 6: BTC° (controlo); M: Marcador PageRuller 26616) .....	39
<b>Figura 3.6:</b> Representação gráfica da velocidade ( $k_{obs}$ ) de reação da O-desbenzilação da DBF metabolizada pelo CYP3A4 em função do tempo, para a fração membranares da estirpe BTC3A4 com PGRMC1 (fração F4) (azul), utilizando como controlo (vermelho) a mesma fração, mas sem adição de fração purificada de PGRMC1.....	40
<b>Figura 3.7:</b> Representação gráfica da velocidade de reação ( $k_{obs}$ ) da O-desetilação da EthR para o CYP1A2, da 7-hidroxilação da cumarina para o CYP2A6 e da O-desbenzilação da DBF para o	

CYP3A4 de CYP em função da estequiometria PGRMC1:CYP, para as frações membranares das estirpes BTC1A2 (azul), BTC2A6 (verde) e BTC3A4 (vermelho), respetivamente .....	41
<b>Figura 3.8.:</b> Representação gráfica da velocidade de reação ( $k_{obs}$ ) da O-desetilação da EthR para o CYP1A2 em função de concentrações crescentes de CYB5 purificado, para as frações membranares das estirpes BTC1A2_PGRMC1 (azul), BTC1A2 (azul tracejado) e controlo em função de concentrações crescentes de BSA (amarelo).....	42
<b>Figura 3.9:</b> Representação gráfica da velocidade de reação ( $k_{obs}$ ) da 7-hidroxilação da cumarina para o CYP2A6 em função de concentrações crescentes de CYB5 purificado, para as frações membranares das estirpes BTC2A6_PGRMC1 (verde), BTC2A6 (verde tracejado) e controlo em função de concentrações crescentes de BSA (amarelo).....	42
<b>Figura 3.10:</b> Representação gráfica da velocidade de reação ( $k_{obs}$ ) da O-desbenzilação da DBF para o CYP3A4 em função de concentrações crescentes de CYB5 purificado, para as frações membranares das estirpes BTC3A4_PGRMC1 (vermelho), BTC3A4 (vermelho tracejado) e controlo em função de concentrações crescentes de BSA (amarelo).....	43
<b>Figura 3.11:</b> Histograma da velocidade de reação da O-desetilação da EthR para o CYP1A2, em função da estequiometria entre PGRMC1:CYP e CYB5:CYP, para a fração membranares da estirpe BTC1A2_PGRMC1.....	44
<b>Figura 3.12:</b> Histograma da velocidade de reação da 7-hidroxilação da cumarina para o CYP2A6, em função da estequiometria entre PGRMC1:CYP e CYB5:CYP, para a fração membranares da estirpe BTC2A6_PGRMC1.....	44
<b>Figura 3.13:</b> Histograma da velocidade de reação da O-desbenzilação da DBF para o CYP3A4, em função da estequiometria entre PGRMC1:CYP e CYB5:CYP, para a fração membranares da estirpe BTC3A4_PGRMC1.....	45
<b>Figura 3.14:</b> Espectro diferencial PGRMC1 nos comprimentos de onda entre 380 e 620 nm, quando reduzida pela CPR. ....	46
<b>Figura 3.15:</b> Espectro diferencial de redução da PGRMC1 com ditionito de sódio (azul), nos comprimentos de onda entre 380 e 620 nm.....	47

## LISTA DE ABREVIACÕES E SBOLOS

**Amp:** Ampicilina

**Cm:** Cloranfenicol

**CPR:** NADPH-oxidoreductase do citocromo P450

**CYB5:** Citocromo *b*<sub>5</sub>

**CYP:** Citocromo P450

**DBF:** Dibenzilfluoresceína

**DMSO:** Dimetilsulfóxido

**EDTA:** cido etilenodiamino tetra-acético

**EthR:** Etoxiresorufina

**FAD:** Flavina adenina dinucltido

**FMN:** Monoflavina nucleótido

**G-6-P:** Glucose 6-fosfato

**G-6-PD:** Glucose 6-fosfato desidrogenase

**IPTG:** Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiransido

**Kan:** Canamicina

**LB:** Meio Luria-Bertani

**NADH:** Dinucleótido de nicotinamida e adenina, forma reduzida

**NADPH:** Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina, forma reduzida

**PGRMC1:** *Progesterone receptor membrane component 1*

**PMSF:** Fluoreto de fenilmetilsulfonil

**POR:** Gene que codifica para a proteína CPR

**RPM:** Rotações por minuto

**TAE:** Tampão Tris-Acetato-EDTA

**TB:** Meio Terrific Broth

**TGE:** Tampão Tris-Glicerol-EDTA

**$\delta$ -Ala:** cido delta-aminolevulínico



## **1. INTRODUÇÃO**





### 1.1. Aspetos gerais do metabolismo de xenobióticos

O ser humano está exposto a diversos xenobióticos como fármacos, toxinas ou poluentes. A eliminação desses xenobióticos está dependente da biotransformação, mediada por enzimas específicas como é o caso dos citocromos P450 (CYPs). Este é um processo metabólico que implica a alteração das propriedades físico-químicas dessas moléculas, tornando-as em produtos mais fáceis de serem excretados pelo organismo e, consequentemente, favorecendo o processo de destoxificação (Parkinson 2001; Jancova *et al.*, 2010). As reações de biotransformação ocorrem em todo o organismo, mas é no fígado que acontecem maioritariamente, dividindo-se em duas fases (Timbrell and Marrs, 2009).

Na fase I, os CYPs constituem a mais importante família de enzimas para a biotransformação, visando a metabolização de compostos lipofílicos em compostos mais polares e solúveis, alterando as propriedades estruturais e fisiológicas de compostos que favorecem a absorção para compostos que favorecem a excreção (Parkinson 2001; Timbrell and Marrs, 2009; Guengerich *et al.*, 2016). Nas reações de fase II dá-se um aumento da hidrofília dos compostos através de enzimas que reconhecem e reagem com os grupos funcionais introduzidos na fase I da biotransformação ou já presentes nos xenobióticos, facilitando a sua excreção (Parkinson 2001; Jancova *et al.*, 2010).

A forma como o organismo metaboliza um determinado composto é diferente de indivíduo para indivíduo. A variabilidade inter e intraindividual na expressão e atividade de enzimas de metabolização de fármacos, transportadores e seus reguladores é um dos principais determinantes na resposta aos fármacos, não só em termos de eficiência, mas também em relação a reações adversas (Ryu *et al.*, 2017).

### 1.2. Citocromo P450 (CYP)

Os CYPs são a mais importante classe de enzimas responsáveis pela metabolização de uma grande variedade de compostos exógenos, tais como fármacos, químicos carcinogénicos e poluentes ambientais, mas também compostos endógenos incluindo esteróides, ácido retinóico, vitamina D3, lanosterol, estrogénios e androgénios. Entre os CYPs existem três famílias, CYP1, CYP2 e CYP3, que contribuem para o metabolismo de cerca de 70% dos fármacos prescritos (Oda *et al.*, 2011). A designação *citocromos P450* deve-se ao facto destas hemoproteínas apresentarem no seu espetro diferencial um pico característico a 450 nm, na sua forma reduzida e quando complexados com monóxido de carbono (Omura and Sato, 1964).

Estas enzimas existem em praticamente todas as espécies, desde bactérias, fungos, plantas até aos mamíferos (Nebert *et al.*, 2013). Nos eucariontes, algumas isoformas CYP estão localizadas na membrana interna das mitocôndrias, onde são responsáveis pela biossíntese de esteróides, sendo o seu

parceiro redox a adrenodoxina redutase. Por outro lado, a maioria dos CYPs localiza-se na membrana do retículo endoplasmático, utilizando como parceiro redox a NADPH-oxidoreductase do citocromo P450 (CPR). Nos mamíferos, os CYPs são maioritariamente expressos no fígado, mas estão presentes em todos os tecidos do organismo (Bibi, 2008). Estudos indicam que do ponto de vista da estequiometria, *in vivo*, existe um excesso de CYP em relação à CPR. Assim, em vez de haver formação de um complexo CYP:CPR estável, os CYPs formam interações transientes com a CPR. Está também descrito que os CYPs podem receber elétrons do citocromo *b*<sub>5</sub> (CYB5), que além de poder fornecer o segundo elétron ao CYP, também pode ter um efeito alostérico sobre os CYPs, com impacto na atividade, todavia essa interação é menos compreendida (Szczesna-Skorupa and Kemper, 2010; Ryu *et al.*, 2017), parecendo estar dependente da isoforma CYP e do tipo de substrato a ser metabolizado (Palma *et al.*, 2013).

Nos humanos, existem 57 CYPs identificados (Tabela 1), dos quais 50 pertencem à fração localizada no retículo endoplasmático e os restantes sete têm localização mitocondrial (Omura 2010; Guengerich *et al.*, 2016). Devido à diversidade de isoformas, foi necessário criar uma nomenclatura universal, tendo sido convencionada uma classificação com base na sequência de aminoácidos. Portanto, os CYPs que partilham mais de 40% de identidade na sequência de aminoácidos, pertencem à mesma família e são designados por um número (p.e. CYP1). CYPs da mesma família e que partilhem 55% de identidade, pertencem à mesma subfamília e são descritos por uma letra (p.e. CYP1A). Por último, um número após a letra indica a isoenzima (p.e. CYP1A2) (Nelson *et al.*, 1996; Nebert *et al.*, 1987).

Os CYPs têm um peso molecular que pode variar com a isoforma em questão e que é de aproximadamente 57 kDa. São enzimas extremamente versáteis, sendo capazes de catalisar inúmeras reações de biotransformação com uma infinidade de diferentes classes de substratos, de tal forma que cada CYP tem a capacidade de metabolizar inúmeros substratos diferentes (Nebert *et al.*, 2013; Guengerich *et al.*, 2015).

**Tabela 1.1:** Classificação dos citocromos P450 humanos, de acordo com o tipo de substrato que metabolizam (adaptado de Guengerich *et al.*, 2015)

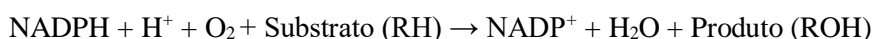
Esteroides	Xenobióticos	Ácidos Gordos	Eicosanóides	Vitaminas	Desconhecido
1B1*	1A1*	2J2	4F2	2R1**	2A7
7A1*	1A2*	2U1	4F3	24A1**	2S1
7B1	2A6*	4A11	4F8	26A1	4A22
8B1	2A13*	4B1**	5A1	26B1	20A1
11A1*	2B6*	4F11	8A1*	26C1	
11B1	2C8*	4F12	<u>2W1</u>	27B1	
11B2*	2C9*	4V2		27C1	
17A1*	2C18	4F22			
19A1*	2C19*	<u>4X1</u>			
21A2*	2D6*	<u>4Z1</u>			
27A1	2E1*				
39A1	2F1				
46A1*	3A4*				
51A1*	3A5*				
	3A7				
	3A43				

\*Estrutura cristalina publicada \*\*Ortólogo animal

Sublinhado vermelho indica reações putativas

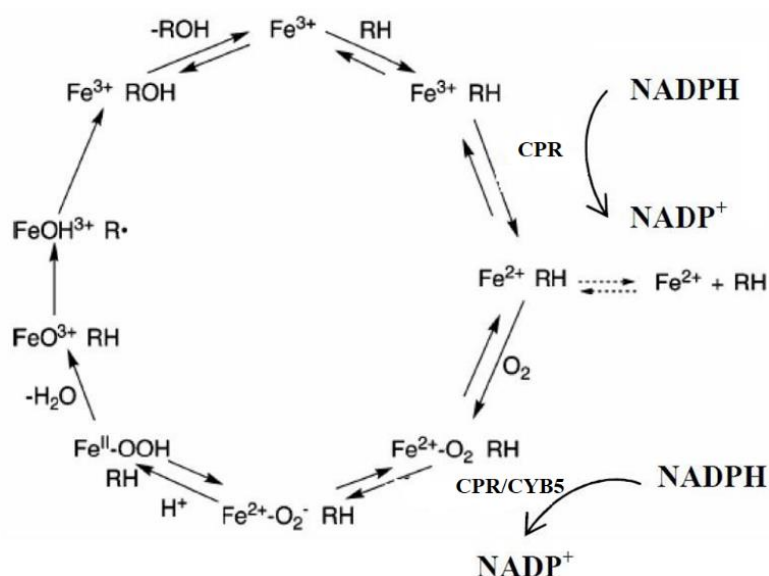
### 1.2.1. O ciclo catalítico

Os CYPs catalisam uma grande variedade de reações de oxidação e redução, envolvendo centenas de substratos, mas apesar de serem denominados de citocromos eles não transferem elétrons para outras proteínas. Na realidade, são oxigenases, na medida que uma molécula de oxigénio fornece um átomo que é incorporado no substrato, sendo outro átomo reduzido a água pelo equivalente redutor neste caso o NADPH. De forma reduzida, a reação pode ser representada pela seguinte equação (Bibi 2008; Pandey and Flück, 2013):



Esta reação, em CYPs de seres eucariontes, requer que dois elétrons sejam doados pela CPR, um de cada vez, em duas etapas distintas do ciclo de reação. O substrato sofre vários tipos de reações no ciclo catalítico (Figura 1.1) (Guengerich, 2007), iniciando-se pela ligação deste ao centro ativo da enzima, o que conduz a um aumento do potencial de oxidação-redução do grupo heme. O átomo de ferro é reduzido pelo elétron do NADPH a  $\text{Fe}^{2+}$  e o oxigénio molecular liga-se ao complexo CYP-substrato, onde há a transferência de um segundo elétron. Há um rearranjo com a inserção de um

átomo de oxigénio no substrato, com formação de uma molécula de água. O produto é libertado e a enzima retorna ao estado original (Pandey and Flück, 2013).



**Figura 1.1:** Ciclo catalítico dos citocromos P450 (CPR: NADPH-oxidoreductase do citocromo P450; RH: Substrato; ROH: Produto; CYB5: citocromo  $b_5$ ) (adaptado de Guengerich, 2007)

### 1.2.2. Isoformas e variantes genéticas do citocromo P450

É conhecida a existência de diferentes CYPs, que variam na sua atividade e níveis de expressão, sendo que esta variância ocorre entre isoformas, mas também entre indivíduos (Guengerich, 2005). Considera-se que a variabilidade inter-individual de origem genética é responsável por cerca de 20-40% das diferentes respostas a fármacos (Ingelman-Sundberg, 2001). As isoformas CYP estão bem caracterizadas, em particular para as famílias CYP1, CYP2 e CYP3 (Zanger *et al.*, 2008; Guengerich *et al.*, 2016). Os CYPs mais importantes na metabolização de fármacos, determinando a eficácia do tratamento são o CYP2C9, 2C19, 2D6 e 3A4 (Tabela 1.1) (Ingelman-Sundberg, 2001, Zanger *et al.*, 2008).

O CYP1A2 é a principal enzima da família CYP1, expressa no fígado humano, correspondendo a cerca de 10% do seu conteúdo em CYP. Catalisa a bioativação de pré-carcinogénicos e desempenha um papel preponderante na metabolização da cafeína e da melatonina, mas também na metabolização de alguns fármacos (Zanger *et al.*, 2008). As diferenças inter-individuais nos níveis de expressão e atividade deste CYP, contribuem para que haja diferenças significativas entre indivíduos na eliminação de xenobióticos, podendo deste modo existir relevância clínica (Anzenbacher and Anzenbacherová, 2001). Estudos sugerem que estas variações podem dever-se a fatores genéticos, mas a hipótese de fatores ambientais não é descartada, sendo o tabagismo ou a dieta possíveis indutores. Diversos estudos apontam ainda para uma relação entre a atividade do CYP1A2 com o aumento do risco de desenvolvimento de cancro. Tal pode dever-se à formação de

metabolitos reativos, que podem causar mutações, originando tumores (Anzenbacher and Anzenbacherová, 2001; Guengerich, 2005).

Apesar do CYP2A6 metabolizar apenas cerca de 2% dos fármacos prescritos, é de realçar a sua extrema importância na metabolização de uma grande variedade de genotóxicos (Ingelman-Sundberg, 2001; Zanger *et al.*, 2008). Corresponde a cerca de 7% do conteúdo de CYP na fração hepática, mas também é expresso na mucosa nasal, traqueia e pulmões. É a principal enzima envolvida na destoxificação da nicotina, na hidroxilação da cumarina e ainda no metabolismo de alguns fármacos e ativação de carcinogénicos (Parkinson, 2008). Alguns estudos sugerem que em tumores hepáticos, existe uma sobre expressão deste CYP e que tal está associada à inflamação crónica e à cirrose. Todavia, variantes genéticas do CYP2A6 podem reduzir a predisposição para cancro do pulmão, em indivíduos expostos ao fumo do tabaco, presumivelmente porque existe uma menor capacidade de bioativar os metabolitos cancerígenos da nicotina. Também, estes indivíduos têm tendência a fumar em menor quantidade, eventualmente porque as concentrações de nicotina se mantêm durante mais tempo (Zanger *et al.*, 2008).

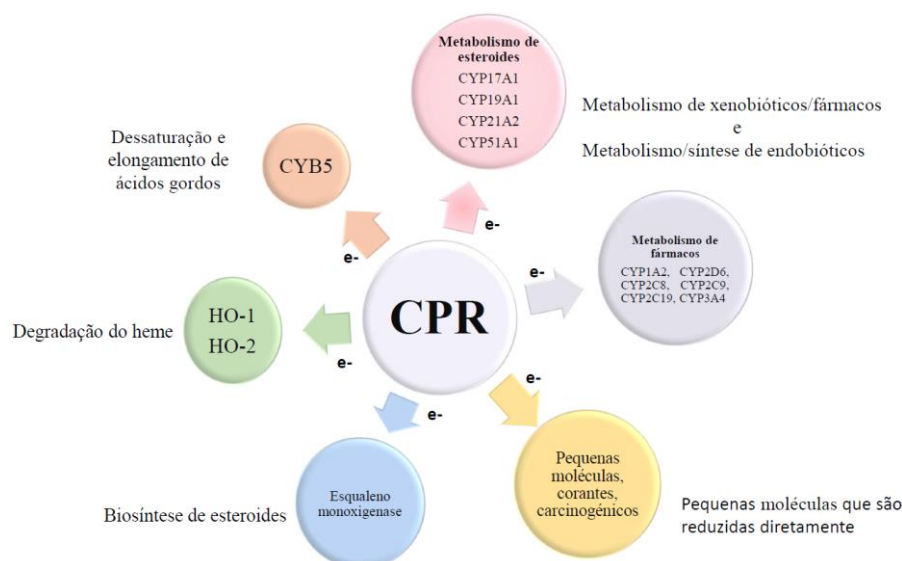
A família CYP3 consiste apenas numa subfamília, o CYP3A, sendo este o CYP com maior expressão hepática. O CYP3A4 parece ter um papel importante na metabolização de cerca de 30% dos fármacos prescritos. É também expresso na próstata, cólon, intestino e cérebro. Os xenobióticos que são absorvidos pelo intestino delgado são metabolizados pelo CYP3A4 e a sua expressão é dependente de género (Zanger *et al.*, 2008). É capaz de metabolizar substratos de elevada dimensão molecular, como quimioterapêuticos, mas também moléculas mais pequenas. Alguns estudos genéticos identificaram polimorfismos no CYP3A4, principalmente em populações de origem oriental, sendo que estes estudos sugerem alteração na ativação de quimioterapêuticos afetando, de forma ainda pouco clara, a quimioterapia. (Ingelman-Sundberg, 2001).

### 1.3. NADPH-oxidoreductase do citocromo P450 (CPR)

A CPR é uma diflavina com aproximadamente 78 kDa, localizada no retículo endoplasmático (Pandey e Flück 2013). Nos humanos, é codificada pelo gene *POR*, localizado no cromossoma 7q11.23, que consiste em 15 exões que dão origem a uma proteína com 680 aminoácidos (RefSeq protein: NP\_000932, UniProt P16435) (Pandey and Sproll, 2014).

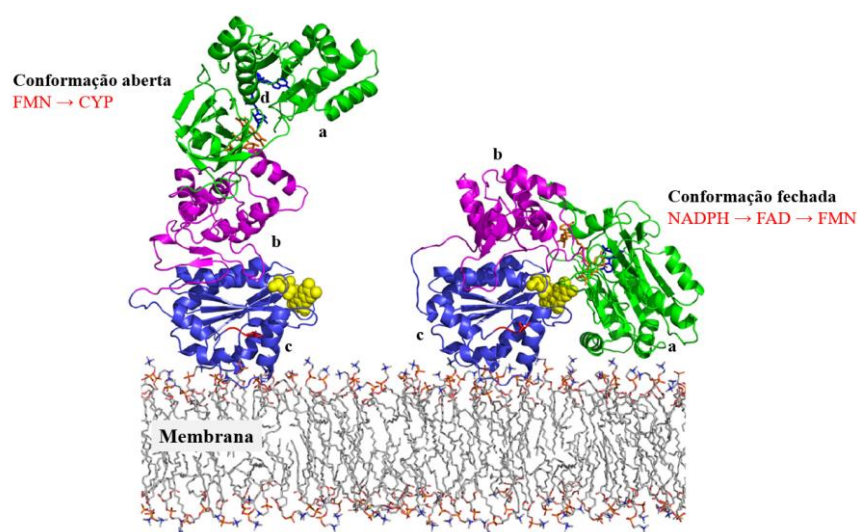
Foi primeiramente identificada por Horecker em 1949 (Horecker and Heppel, 1949), como uma redutase do citocromo *c*. No entanto, a CPR não é a dadora natural de eletrões desta biomolécula e, portanto, esta reação não ocorre *in vivo*. Estudos posteriores demonstraram que a CPR também sustenta a atividade de outras enzimas (Figura 1.2). A CPR é o dador obrigatório para todos os CYPs microsomiais, heme oxigenase (HO) e esqualeno monoxigenase, mas também pode doar eletrões a

outras proteínas como o CYB5. Por isso, a CPR tem um papel central no metabolismo de endobióticos, como a síntese de esteroides, ácidos biliares, vitaminas e também no metabolismo de xenobióticos, incluindo fármacos e toxinas ambientais (Pandey e Flück 2013).



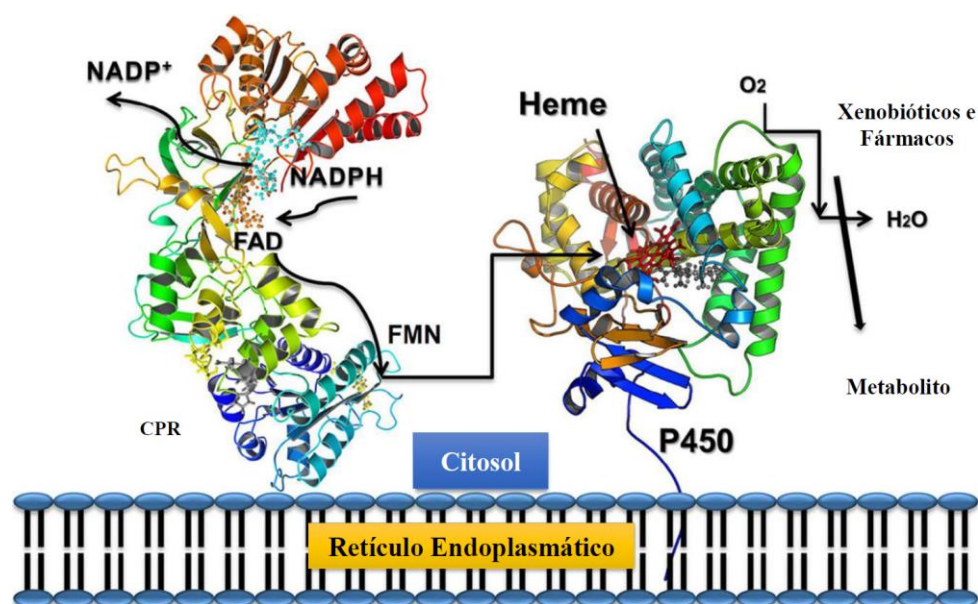
**Figura 1.2:** Visão geral das vias metabólicas em que a CPR está envolvida. (Legenda: CPR- NADPH-oxidoreductase do citocromo P450, CYB5- Citocromo  $b_5$ , HO-1 e HO-2: Hemexigenase 1 e 2) (Pandey e Flück 2013)

A CPR contém duas flavinas, que constituem dois domínios distintos, uma flavina dinucleotídica (FAD) e outra flavina mononucleotídica (FMN) (Figura 1.3) (Pandey e Flück 2013). Possui ainda mais dois domínios, um de conexão flexível, denominado de *linker domain*, que está envolvido na dinâmica de transição entre as conformações aberta e fechada e, um quarto domínio denominado de NADPH, onde a molécula NADPH interage e fornece os elétrons à CPR (Iyanagi *et al.*, 2012; Pandey e Flück 2013).



**Figura 1.3:** Modelo do equilíbrio conformacional da CPR. Representação da proteína ligada à membrana pela região N-terminal hidrofóbica. À direita, representação da conformação fechada, apropriada para a transferência de elétrons entre flavinas. À esquerda, representação da conformação aberta, com o domínio FMN exposto, indicado para transferência de elétrons para o CYP. a- FAD, b- domínio de ligação (*linker domain*), c- FMN; d- domínio NADPH (adaptado de Ellis *et al.*, 2009).

A transferência de elétrons para os CYPs dá-se por um processo complexo, denominado de transferência faseada (*gated*), em que dois elétrons são transferidos da CPR para o CYP, um de cada vez, tal como descrito no ciclo catalítico representado na Figura 1.1. Em primeiro lugar, o NADPH liga-se ao seu domínio específico, próximo da FAD, havendo a transferência de dois elétrons. Em seguida, a proteína altera a sua conformação para fechada, onde os domínios FAD e FMN ficam mais próximos, ocorrendo transferência eletrônica entre as flavinas. Para haver transferência de elétrons para os CYPs, é necessário que a proteína retorne à conformação aberta, para que deste modo, o domínio FMN fique disponível para interação com o CYP (Figura 1.4) (Pandey and Sproll, 2014), permitindo a transferência do elétron para o grupo heme. Todo este mecanismo é possível devido ao domínio flexível da proteína, que funciona como uma espécie de dobradiça, permitindo a transição entre conformações (Iyanagi *et al.*, 2012; Pandey and Sproll, 2014).



**Figura 1.4:** Modelo representativo do processo de transferência de elétrons provenientes da CPR para o CYP (adaptado Pandey and Sproll, 2014).

Polimorfismos no gene *POR* têm sido associados a alterações na atividade enzimática e, consequentemente, redução da atividade de enzimas dependentes da CPR, nomeadamente dos CYPs. Existem mais de 50 haplótipos do gene *POR* e alguns deles estão associados a doenças genéticas como o síndrome de Antley-Bixler (ABS), uma doença genética rara. Muitas das mutações encontradas causam a redução da atividade da CPR, tendo sido identificadas mutações nos domínios FAD e FMN (Moutinho *et al.*, 2012; Pandey and Sproll, 2014).

#### 1.4. Citocromo $b_5$ (CYB5)

O CYB5 é uma pequena proteína heme de aproximadamente 15.4 kDa, (Bhatt *et al.*, 2017) que se encontra numa grande variedade de organismos e cuja homologia na sequência de aminoácidos entre as várias espécies é elevada. Em mamíferos, existem três isoformas diferentes: a forma microsomal (ligada à membrana do retículo endoplasmático, com 134 aminoácidos), a forma mitocondrial (ligada à membrana mitocondrial, com 146 aminoácidos) e a forma solúvel citosólica (de 98 aminoácidos) (Bhatt *et al.*, 2017; Vivekanandan *et al.*, 2015). Estas isoformas são expressas nos mais variados tecidos, incluindo tecido adrenal, gonadas, fígado, rim, baço, pulmões e cérebro. Participam em inúmeras reações tais como, dessaturação e elongação de ácidos gordos, biossíntese de fosfolípidos e colesterol, redução da metemoglobina a hemoglobina e biossíntese de ácido N-glicolilneuramínico (Storbeck *et al.*, 2012; Bhatt *et al.*, 2017; Porter T.D. 2002).

O CYB5 microsomal foi descoberto em 1952 por Strittmatter e seus colegas (Strittmatter and Ball, 1952) e é considerado de elevada importância metabólica devido às suas funções na síntese de esteroides (Storbeck *et al.*, 2012). O primeiro domínio consiste num N-terminal que contém o grupo heme, um domínio C-terminal que permite a ancoragem à membrana e, por último, um domínio de ligação que conecta os outros domínios (Dürr *et al.*, 2007; Vivekanandan *et al.*, 2015; Bhatt *et al.*, 2017). O domínio que contém o grupo heme é essencial para a transferência de eletrões e inclui resíduos que permitem a ligação do CYB5 aos seus parceiros redox (Storbeck *et al.*, 2012). O CYB5 aceita eletrões oriundos do NADH e do NADPH, cuja transmissão é intermediada pelas enzimas NADH-redutase do CYB5 e em alternativa pela CPR, respetivamente. O CYB5 tem a capacidade de transferir posteriormente os eletrões recebidos para outras enzimas, como é o caso dos CYPs (Porter T.D. 2002).

No início dos anos 1970, Hildebrandt e Estabrook, provaram que o CYB5 aumenta o metabolismo de vários substratos metabolizados por CYPs (Hildebrandt and Estabrook, 1971). Desde então vários estudos foram feitos, mas o papel funcional do CYB5 na metabolização mediada por CYPs demonstrou ser bastante complexo, pois este pode estimular, inibir ou não ter qualquer efeito nas reações que envolvem os CYPs (Bart and Scott, 2017; Zhang *et al.*, 2015). A interação do CYB5 com os CYPs parece ser dependente da isoforma CYP, como mostrado em alguns estudos, nos quais se observava um aumento de atividade catalítica dos CYPs 3A4, 2C9, 2A6 e 2E1 (Yamazaki *et al.*, 2001; Duarte *et al.*, 2007) na presença de CYB5, enquanto que para o CYP1A2 não se observava nenhum efeito (Duarte *et al.*, 2007). Também, foi observado que o CYB5 exerce um papel fundamental nos CYPs envolvidos na metabolização de esteroides, como no caso do CYP17A1 (Bhatt *et al.*, 2017), onde um efeito alostérico também parece estar implicado na sua acção sobre o CYP.



Devido aos potenciais redox do CYB5 e do CYP, sabe-se que durante o ciclo catalítico dos CYPs (Figura 1.1) o primeiro eletrão transferido para o CYP é proveniente da CPR, contudo o potencial redox para o segundo eletrão indica que é possível a transferência via CYB5, além da CPR (Zhang *et al.*, 2007). A variação do papel do CYB5 nas reações catalíticas mediadas por CYPs depende não só da isoforma CYP mas também do substrato e das condições físico-químicas do local de reação (Bhatt *et al.*, 2017). Tal efeito pode ser atribuído a uma modelação alostérica que resulta em alterações na forma de ligação do substrato ou na transferência de eletrões (Bart and Scott, 2017).

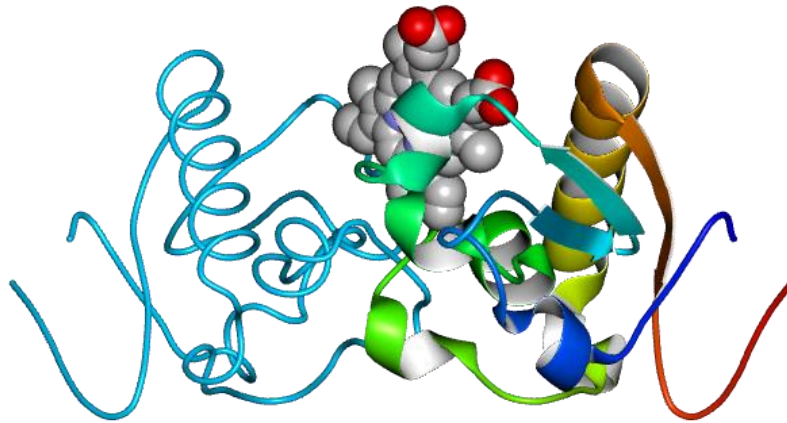
### 1.5. *Progesterone Receptor Membrane Component 1 (PGRMC1)*

O acrónimo PGRMC1 é proveniente do inglês *Progesterone Receptor Membrane Component 1* e é a nomenclatura aprovada pelo comité de nomenclatura de genes de HUGO (HGNC: 16090). É uma proteína altamente conservada e amplamente distribuída entre organismos eucariontes (Oda *et al.*, 2011). Pertence a uma família de proteínas de recetores de progesterona associado à membrana (MAPR – *membrane-associated progesterone receptor*) (HGNC: 1282), relacionadas estruturalmente com o CYB5. Nesta família, além da PGRMC1, estão incluídas também a PGRMC2, neudesina e a neufericina (Ryu *et al.*, 2017).

No decorrer das últimas duas décadas, a PGRMC1 foi identificada por vários grupos de forma independente e em vários contextos biológicos e, por esta razão, foi publicada sob diferentes sinónimos. Foi descoberta e purificada a partir de membranas hepáticas de suínos, em 1996, tendo sido identificada como uma proteína de ligação à progesterona (Meyer *et al.*, 1996). Ainda no mesmo ano, foi identificado o gene que codifica para PGRMC1 em ratos tratados com dioxina, o qual foi designado por 25-Dx (Selmin *et al.*, 1996). Em 1998, o gene da PGRMC1 humana foi clonado e a proteína correspondente designada de Hpr6.6 (do inglês: *heme progesterone receptor 6.6*). Nesse estudo foi identificada outra proteína humana (Dg6), correspondente à PGRMC2 na presente nomenclatura (Gerdes *et al.*, 1998). A PGRMC2 é uma proteína de 247 aminoácidos, estruturalmente similar à PGRMC1, cuja principal diferença entre ambas reside na região N-terminal. Apesar da elevada homologia existem muito poucos estudos em relação à PGRMC2, não se sabendo ao certo qual a sua função biológica (Ryu *et al.*, 2017).

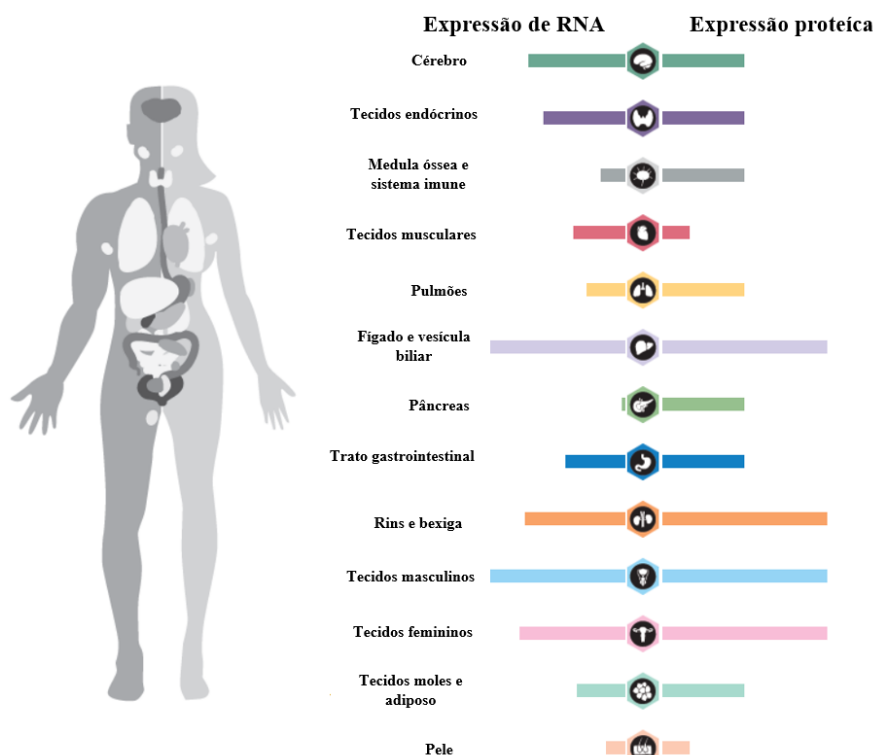
Em 2001, Wehling e seu grupo referiam-se à proteína descrita por Meyer como mPR, por ser um hipotético recetor de progesterona membranar (Falkenstein *et al.*, 2001). No mesmo ano, um outro estudo identificou um antígeno designado por IZA (do inglês: *inner zone antigen*), presente na zona fasciculada e reticular do córtex adrenal. Ao analisar a sequência de cDNA que codifica o IZA, foi descoberto que esta era idêntica à sequência da mPR e 25-Dx (Raza *et al.*, 2001).

A primeira publicação, utilizando o termo “PGRMC1”, data de 2005 (Peluso *et al.*, 2005). Em 2011 a PGRMC1 foi identificada como um possível recetor de Sigma 2 (S2R), um importante biomarcador de proliferação tumoral (Xu *et al.*, 2011). Só em 2016 foi publicada a resolução da estrutura da PGRMC1 humana (Figura 1.5) (PDB ID: 4X8Y), por Kabe e colegas (Kabe *et al.*, 2016).



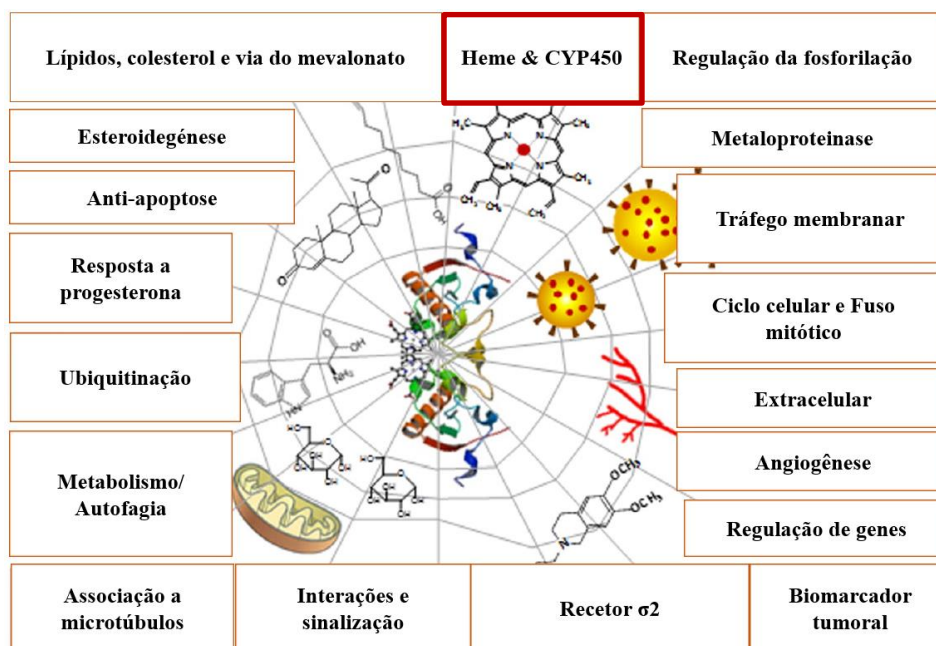
**Figura 1.5:** Estrutura tridimensional da PGRMC1 humana, com representação do grupo heme (cinzento) (PDB ID: 4X8Y).

O gene *PGRMC1* humano está localizado no cromossoma X (Xq22-q24), que codifica uma proteína de 195 aminoácidos (Cahill *et al.*, 2016) com cerca de 25 kDa, no entanto pensa-se que esta proteína poderá existir em diferentes estados de fosforilação resultando em algumas mudanças no peso molecular (Kaluka *et al.*, 2015). A PGRMC1 contém um segmento N-terminal transmembranar e um domínio heme idêntico ao domínio heme do CYB5 (Mifsud and Bateman, 2002; Cahill *et al.*, 2007). PGRMC1 está localizada maioritariamente no retículo endoplasmático, mas pode ser encontrada na membrana plasmática, citoplasma, mitocôndria e núcleo. Em mamíferos, é predominantemente expressa no fígado e rins, mas também se encontra no cérebro, tecido mamário, coração, pulmões, músculo esquelético, pâncreas, tecido reprodutivo e esteroide, entre outros órgãos (Raza *et al.*, 2001; Szczesna-Skorupa and Kemper, 2010; Ryu *et al.*, 2017).



**Figura 1.6:** Visão geral dos dados de expressão de RNA e de proteína gerados no projeto *Human Protein Atlas*. Os tecidos analisados são divididos em grupos codificados por cores, de acordo com as características funcionais que têm em comum. (*Protein Atlas*: ENSG00000101856-PGRMC1)

A PGRMC1 parece ser uma proteína com múltiplas funções (Figura 1.7), destacando-se a sua ligação putativa ao metabolismo de fármacos e hormonas, através da interferência na atividade dos CYPs (Cahill *et al.*, 2016).



**Figura 1.7:** Esquema com as funções putativas da PGRMC1 em diferentes vias metabólicas (adaptado de Cahill *et al.*, 2016).

### 1.5.1. PGRMC1 e o cancro

As células possuem uma variedade de vias para responder a lesões no DNA e esta resposta é essencial para a sobrevivência celular. Essas vias permitem não só remover a lesão causada, como também, atrasar o ciclo celular e suprimir a transcrição de genes. Lesões que não são reparadas podem levar à proliferação das mesmas, paragem no crescimento, senescência, apoptose ou necrose. Assim, proteínas que regulem essas respostas são de extrema importância (Hampton *et al.*, 2015; Crudden *et al.*, 2005.a). A sobre expressão da PGRMC1 em alguns tipos de cancro, como cancro da mama, pulmão, ovário, cervical, do colón e da tiróide, tem sido associado a alguns desses fenómenos. Outros estudos sugerem que a PGRMC1 é essencial para manter o fenótipo de células cancerígenas, regulando o crescimento celular e a sobrevivência celular, estando implicada na resistência a danos e na resistência a fármacos (Cahill *et al.*, 2016).

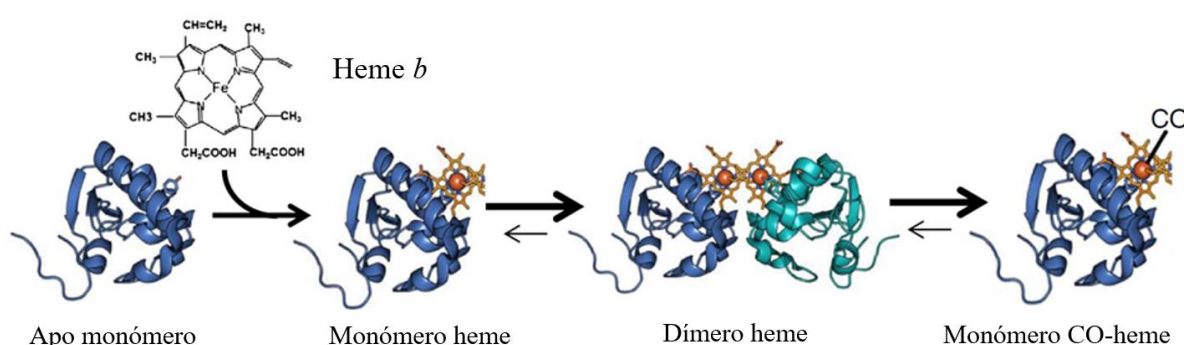
Nos estudos conduzidos por Crudden, em 2005, foi notório que a expressão de PGRMC1 era significativamente elevada em células tumorais mamárias quando comparada com tecido normal, ficando demonstrada alguma sobre expressão em células tumorais do colon e da tiróide (Crudden *et al.*, 2005.a, Crudden *et al.*, 2005.b). Segundo Lin e seus colegas, a PGRMC1 induz o potencial de invasão e migração de células tumorais (Lin *et al.*, 2015). Estes estudos indicam que a PGRMC1 é necessária na transformação do comportamento deste tipo de células e implica a sua necessidade nas fases iniciais de cancro, na sua progressão e no comportamento metastático, sendo por isso uma proteína fundamental para todo o processo tumoral (Crudden *et al.*, 2005.a; Lin *et al.*, 2015).

De forma a investigar o papel da PGRMC1 na suscetibilidade à quimioterapia, Crudden e seus colaboradores estudaram a inibição da expressão de PGRMC1 em culturas de células tratadas com doxorubicina e camptotecina, dois importantes quimioterapêuticos. Nas culturas com inibição de expressão de PGRMC1 houve um aumento significativo da morte celular em comparação com as culturas de células com expressão normal de PGRMC1, quando expostas aos quimioterapêuticos. Além de que, a mutação no domínio de ligação ao heme, demonstrou aumentar a suscetibilidade à acção dos quimioterapêuticos. Tal indica que a inibição da PGRMC1 ou mutação no domínio de ligação ao heme aumenta a eficácia dos fármacos destinados à quimioterapia. Estes dados sugerem que, a PGRMC1 está implícita na resistência à quimioterapia e consequentemente a potenciais falhas no sucesso terapêutico para alguns tipos de cancro (Crudden *et al.*, 2005.b).

Em resumo, estes estudos evidenciam que a análise dos níveis de expressão desta proteína poderá ser usada como uma valiosa ferramenta de prognóstico para prever a sobrevivência de um doente e também como um potencial biomarcador para diferentes tipos de cancro. Adicionalmente, também poderá ser considerado como um importante alvo no tratamento de tumores que impliquem o fenómeno de quimioresistência.

### 1.5.2. Funcionalidade da PGRMC1

Estudos de cristalografia recentes revelaram que a PGRMC1 pode formar um dímero estável e que esta formação só é possível através da associação de um grupo heme (Figura 1.8) (Kabe *et al.*, 2016). Estudos demonstraram que a privação de ferro suprime a tumorigênese, sugerindo que o grupo heme é bastante importante na proliferação tumoral, por esta razão, muita atenção se tem dado a esta questão (Bastide *et al.*, 2011). Por outro lado, alguns estudos indicam que o monóxido de carbono, gás gerado por degradação oxidativa do grupo heme, inibe a proliferação tumoral. Assim, um balanço entre a quantidade de heme e de monóxido de carbono desempenha um papel balanceador fundamental no desenvolvimento tumoral, apesar dos mecanismos associados não serem completamente conhecidos (Yamamoto *et al.*, 2014, Kabe *et al.*, 2016).



**Figura 1.8:** Modelo transitório da regulação da estrutura da PGRMC1 em resposta ao grupo heme e ao monóxido de carbono (adaptado de Kabe *et al.*, 2016)

Kabe e seus colaboradores, mostraram que a dimerização da PGRMC1 é essencial para se ligar ao EGFR (do inglês: *epidermal growth factor receptor*) e aos CYPs e dessa forma exercer a sua função. Deste modo, a PGRMC1 parece promover a proliferação celular, mas também parece estar envolvida na metabolização de quimioterapêuticos. Nesse estudo, foi utilizada uma forma *wild type* e uma variante (Y113F) da PGRMC1, cujo resíduo (Tyr113) está envolvido na ligação ao grupo heme. Ficou demonstrado que o dímero de PGRMC1 se dissociava em monômeros, dependendo dos níveis de monóxido de carbono, sugerindo que a PGRMC1 serve como uma espécie de “interruptor” molecular, sensível ao monóxido de carbono que regula a proliferação de células tumorais. Nesse estudo foi analisada a interação da PGRMC1 com os CYP1A2 e 3A4 em microsomas co-expressos com CYB5 e CPR, tendo sido concluído que houve interação entre os CYPs e a PGRMC1, mas não com a variante Y113F que não permite a incorporação de heme, sugerindo um papel importante da dimerização na interação com os CYPs (Kabe *et al.*, 2016).

### 1.6. Interações citocromo P450:PGRMC1

Estudos recentes mostram que a PGRMC1 interage com diversos CYPs em eucariontes unicelulares e em organismos multicelulares, mas também que tem a capacidade de estimular a

biossíntese de esteroides (Rohe *et al.*, 2009, Ryu *et al.*, 2017). A primeira evidência foi observada em leveduras, através do estudo da proteína homóloga Dap1 (do inglês: *damage-associated response protein*). Nesse estudo, foi mostrado que Dap1 medeia a resistência a fármacos antifúngicos, através da ativação da Erg11 (equivalente ao CYP51 humano). Ainda, células com níveis baixos de Dap1 eram mais sensíveis a lesões no DNA e demonstraram uma paragem inicial na síntese de esteroides (Hand *et al.*, 2003; Mallory *et al.*, 2005).

Em 2007, foi observado que a deleção da PGRMC1 reduzia a atividade do CYP51, bloqueando a síntese de colesterol. Estudos de co-imunoprecipitação demonstraram ligação estável entre a PGRMC1 e os CYP51, 3A4, 7A1 e 21A2, indicando assim funções ligadas à síntese de colesterol, metabolização de fármacos, metabolismo hormonal e na síntese de ácidos biliares (Hughes *et al.*, 2007).

Szczesna-Skorupa e Kemper (2010) sugerem que a PGRMC1 se liga a CYPs envolvidos no metabolismo de xenobióticos, mas não têm efeito na sua distribuição ou retenção no retículo endoplasmático. No estudo analisaram os CYPs 2C2, 2C8 e 3A4 e, concluíram que a PGRMC1 inibia a atividade de todos (Szczena-Skorupa and Kemper, 2010). Paralelamente, Oda e seus colaboradores, usando sistemas de co-expressão, reportaram um aumento na atividade do CYP3A4, uma inibição no CYP2C9, sendo que para o CYP2E1 a atividade não sofreu alteração significativa (Oda *et al.*, 2011), sugerindo que o mecanismo de acção da PGRMC1 é dependente da isoforma CYP.

## 1.6. Objetivo do trabalho prático

Por muito tempo, julgava-se que a CPR e o CYB5 eram as únicas proteínas a interagir com os CYPs, mas alguns estudos vieram mostrar que a PGRMC1 interage com o complexo proteico CYP. No entanto, os mecanismos implícitos nestes processos são ainda pouco compreendidos e, devido ao seu possível envolvimento na quimioresistência, muitos olhares se têm voltado para o estudo desta proteína. Assim, esta dissertação tem como principal objetivo avaliar a interação da PGRMC1 com o complexo enzimático CYP e o seu impacto no metabolismo mediado por este complexo, mais precisamente no metabolismo de fármacos. Ainda, pretende-se avaliar: i) a existência de efeito competitivo entre o CYB5 e a PGRMC1, para ligação ao CYP e, deste modo, avaliar o local de ligação putativo da PGRMC1 ao CYP; ii) o efeito da PGRMC1 na atividade do complexo enzimático CYP, dependendo do estado conformacional da PGRMC1 e iii) a possibilidade de a CPR reduzir a PGRMC1.

Genericamente, utilizou-se um modelo bacteriano que permitiu a co-expressão de CYP, CPR e PGRMC1. Com esse sistema foi possível avaliar a atividade catalítica de CYPs, representativos do metabolismo de fármacos, como o CYP1A2, 2A6 e 3A4, na presença ou ausência de PGRMC1. Esta

abordagem baseou-se na capacidade dos CYPs metabolizarem substratos fluorogénicos e, assim ser possível medir velocidade de reação dessa metabolização, quando influenciada pela presença de PGRMC1. Numa primeira fase, prepararam-se membranas, a partir das estirpes BTC, com co-expressão do complexo enzimático CYP e, opcionalmente, co-expressas com PGRMC1, tendo-se avaliado a velocidade de metabolização dos substratos fluorogénicos. Deste modo, foi possível comparar a eficácia de metabolização de cada isoforma na presença e na ausência de PGRMC1. Numa segunda fase, purificou-se PGRMC1, o que permitiu a titulação de frações membranares contendo o complexo CYP com PGRMC1 e ainda, avaliar o efeito competitivo entre a PGRMC1 e o CYB5. Na última fase desta dissertação, procedeu-se a ensaios espectrofotométricos de redução da PGRMC1 pela CPR.





## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**



## 2.1. MATERIAIS

Nas tabelas 2.1.1 a 2.1.4 são apresentados reagentes, meios de cultura, soluções, estirpes de *E. coli* e respetivos plasmídeos usados no decurso do trabalho experimental.

**Tabela 2.1.1:** Lista de reagentes utilizados no trabalho experimental e respetivas marcas

<b>Marca</b>	<b>Reagente</b>
Abnova	PGRMC1 purificada
Acros Organics	Ácido 2-morfolinoetanosulfónico, Hidróxido de sódio
Becton Dickison	MacConkey ágar, Peptona, Triptona
Bioline	Agarose, DNA Loading buffer 5x, HypperLadder I
Bio-Rad	Comassie Blue, Glicina, Membrana PVDF, Mini-Protein® TGX™ Precast Gel, SDS
Biotium	Gel Red 10 000x
BioVision	CHAPS
Boster Bio	Anticorpo policlonal anti-PGRMC1 ( <i>rabbit</i> )
Fisher Scientific	Ágar, Cloreto de sódio, Extrato de levedura, HisPur Cobalt Resin, Meio Luria-Broth, PageRuler 26616, GeneJET Plasmid Miniprep Kit, His GraviTrap TALON®
Gerbu	NADP <sup>+</sup> , PMSF
Life Technologies	Kit Qdot invitrogen 625
New England BioLabs	Albumina sérica bovina (BSA)
PanReac	Ácido acético glacial, Fosfato monopotássico
Sigma-Aldrich/Merck	4- bromofluorobenzeno, Ácido clorídrico, Ampicilina, Arginina, Azida de sódio, Benzonase, Canamicina, Citocromo c, Cloranfenicol, Cloreto de amónio, Cloreto de cálcio dihidratado, Cloreto de cobalto hexahidratado, Cloreto de cobre hexahidratado, Cloreto de ferro hexahidratado, Cloreto de magnésio, Cloreto de Potássio, Cloreto de zinco, Coumarina, DBF, Ditionito de sódio, DMSO, EDTA, EhtR, Fosfato dipotássico, Fosfato disódico, Fosfato monosódico, Glicerol, Glucose, G-6-P, G-6-PD, Imidazole, IPTG, Lisozima, Metanol, Molibdato de sódio dihidratado, NADP <sup>+</sup> , NADPH, Papel de Filtro Whatman 3MM, Persulfato de amónio, Sacarose, Sulfato de magnésio, TEMED, Tiamina, Tris hidrocloreto, Triton x-100, Trizma Base, β-mercaptoetanol, δ-Ala

**Tabela 2.1.2:** Equipamentos utilizados nos vários procedimentos experimentais

<i><b>Equipamento</b></i>	<i><b>Modelo</b></i>	<i><b>Marca</b></i>
Balança	BP61S	Sartorius
	EWB	Kern
	D-37520 Osterode	Kendro
Centrifuga	L7-55 Centrifuge	BECKMAN
	Z233 MK-2	Hermle
ChemiDoc™	ChemiDoc™-Touch	Bio-Rad
Espectrofotômetro	UV-2401PC	Shimadzu
Estufa	EN500	NUVE
Leitor de microplacas	Spectra Max i3x	Molecular Devices
Fonte de eletroforese	Standard Power Back 25	Biometra®
	Power Pac 300	Bio-Rad
Incubadora	Classic G25	New Brunswick Scientific
	Ecotron	INFORS HT
Medidor de pH	Seven compact	Mettler Toledo
Microplacas 96 poços	655209	Greiner Bio-One
	Costar	Corning
Leitor de microplacas	Spectra Max i3x	Molecular Devices
Placa de agitação magnética	AGE	VELP SCIENTIFICA
	AccuPlate™	LabNet
Placa de agitação orbital	GyroTwister	LabNet
Placa de aquecimento	UBD2	Grant
Potter	RZR-1	Heidolph
Sistema de eletroforese	Horizon® 58	Life Technologies
	MiniProtean® Tetra System	Bio-Rad
Sistema de eletroporação	Gene Pulse™ Controler	Bio-Rad
Sonicador	SONOPULS GM2200	Bandelin
Vórtex	L46	Labinco
	ZX3	VELP SCIENTIFICA

**Tabela 2.1.3:** Soluções, meios de cultura e sua composição por litro.

<i>Meio</i>	<i>Composição por Litro</i>
LB	10g triptona, 5g extrato de levedura, 10g NaCl <sup>1,2</sup>
M9	15g ágar, 10 ml glucose 40%, 200 ml sais M9 <sup>1</sup>
MacConkey	50g ágar MacConkey <sup>1</sup>
TB	12g triptona, 24g extrato de levedura, 2g peptona, 8ml glicerol 50% <sup>1</sup> , suplementar com 100 ml de tampão TB
SOB	20 g triptona, 5g extrato de levedura, 0.5 g NaCl <sup>1</sup> , suplementar com 10 ml MgCl <sub>2</sub> 1M <sup>1</sup>
NZY <sup>+</sup>	10g NZ amine, 5g NaCl, 5g extrato de levedura (ajustar o pH a 7.5) <sup>1</sup> , suplementar com 12.5 ml MgCl <sub>2</sub> 1M. 12.5 MgSO <sub>4</sub> 1M e 20 ml de glucose 20% <sup>1</sup>
<i>Soluções</i>	
Descorante de gel SDS-PAGE	450 ml metanol, 100 ml ácido acético glacial
Loading Buffer 5x (SDS-PAGE)	625 µl Tris-HCl 1M pH 6.8, 2 ml glicerol 50%, 2 ml SDS 10%, 50 µl BFB 1%, 500 µ β-mercaptoetanol (V <sub>I</sub> =10ml)
Sais M9 5x	64g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O, 150g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 2,5g NaCl, 5g NH <sub>4</sub> Cl
Tampão corrida 5x (SDS-PAGE)	5g SDS, 15.14g trizma base, 93.84g glicina
TAE 50x	242g trizma base, 57.1 ml ácido acético glacial, 100 ml EDTA 0.5M pH 8.0
Trace Elements	27g de FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O, 2g ZnCl <sub>2</sub> , 2g CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O, 2g Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O, 1g CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O, 1.3g CuCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O, 0.5g H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> e 100 ml HCl
Tampão TB (pH 6.8 ou 7.5)	23.1g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 125.4g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
Tampão citocromo c redutase	6.06g Tris-HCl, 11.18g KCL, 2.03g MgCl <sub>2</sub> , 130.02 mg NaN <sub>3</sub> , 10 ml triton X-100 4% (ajustar pH a 7.5)
Tampão Fosfato de Potássio + 3 mM MgCl <sub>2</sub>	86.6 mL K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 13.4 mL KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 30 mL MgCl <sub>2</sub> 0,1 M
Tampão Fosfato de Sódio	774ml Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1M, 226ml NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1M <sup>1</sup>
Tampão Tris-Glicerol-EDTA (TGE)	9.08g tris-HCl, 9,30 g EDTA, 230 mL glicerol 50%
Tampão Tris-Sacarose	6.06g tris-HCl, 95.58g sacarose (ajustar pH a 7,8) <sup>2</sup>
Tampão transferência 5x (WesternBlot)	2g SDS, 29.06g trizma base, 14.64g glicina, 500 ml Metanol

<sup>1</sup> Autoclavou-se 20 min, a 120°C, <sup>2</sup> Para preparar meio em placas, adicionou-se 15g de ágar antes da autoclavagem

**Tabela 2.1.4:** Características das estirpes BTC e DH5 $\alpha$  de *E. coli* e caracterização dos plasmídeos ao nível de marcadores genéticos

Estirpes	Genótipo	Referência
PD301	<i>ara-14, lacY1, tsx-33, qsr, thi-1, supE44, galK2, <math>\lambda</math>, rac, rfbD1, argE3, mgl-51, rpsL31, kdgk51, xyl-5, mtl-1, uvrA6, galE, <math>\Delta</math>ogt::Cm<sup>R</sup>, ada10, rfa</i>	Duarte <i>et al.</i> , 2005
BTC1A2-POR	PD301/pLCM_PORwt/pCWh_1A2	Duarte <i>et al.</i> , 2005
BTC1A2-PGRMC1/POR	PD301/pLCM_hPGRMC1_PORwt/pCWh_2A6	-
BTC2A6-POR	PD301/pLCM_PORwt/pCWh_2A6	Duarte <i>et al.</i> , 2005
BTC2A6-PGRMC1/POR	PD301/pLCM_hPGRMC1_PORwt/pCWh_1A2	-
BTC3A4-POR	PD301/pLCM_PORwt/pCWh_3A4	Moutinho <i>et al.</i> , 2012
BTC3A4-PGRMC1/POR	PD301/pLCM_hPGRMC1_PORwt/pCWh_3A4	-
BTC <sup>o</sup>	PD301/pLCM/pCWori	Duarte <i>et al.</i> , 2005
POR	PD301/pLCM_POR	
PGRMC1	DH5 $\alpha$ /pCW_hPGRMC1	-
Plasmídeos	Marcadores genéticos relevantes	Referência
pLCM	mucAB <sup>+</sup> , Kan <sup>r</sup> derivado do pACYC177.	Kranendonk <i>et al.</i> , 2008
pLCM_POR	pLCM, contendo cDNA do gene <i>POR</i> que codifica o CPR humano completo.	Kranendonk <i>et al.</i> , 1999
pLCM_hPGRMC1_PORwt	pLCM, contendo o cDNA modificado no N-terminal do PGRMC1 humano e o cDNA do gene <i>POR</i> que codifica a CPR humana completa.	-
pCW	pCWori <sup>+</sup> , vector de expressão em <i>E. coli</i> , Amp <sup>r</sup> , ptac.ptac/LacI <sup>q</sup> , sem cDNA.	Fisher <i>et al.</i> , 1992
pCWh_1A2	pCWori <sup>+</sup> , contendo cDNA modificado no N-terminal do CYP1A2 humano.	Fisher <i>et al.</i> , 1992
pCWh_2A6	pCWori <sup>+</sup> , contendo cDNA modificado no N-terminal do CYP2A6 humano.	Kranendonk <i>et al.</i> , 1999
pCWh_3A4	pCWori <sup>+</sup> , contendo cDNA modificado no N-terminal do CYP3A4 humano	Kranendonk <i>et al.</i> , 1999
pCW_hPGRMC1	pCWori <sup>+</sup> , contendo cDNA modificado no N-terminal do PGRMC1 humano.	-
pCW $\Delta$ _POR	pCWori <sup>+</sup> , contendo cDNA do gene <i>POR</i> que codifica a CPR humana completa.	Kranendonk <i>et al.</i> , 2008

## 2.2. MÉTODOS

### 2.2.1. Preparação de células competentes

#### 2.2.1.1. Preparação de células competentes para eletroporação

Para preparação de células competentes PD301, inoculou-se células bacterianas PD301 em meio LB ágar, suplementado com cloranfenicol a 10 mg/l ( $\text{Cm}^{10}$ ) e incubou-se durante 16h a 37°C. De seguida, inoculou-se uma colónia em meio LB líquido, suplementado com o respetivo antibiótico e incubou-se durante 16h, a 37°C com agitação (210 rpm). Juntou-se 1 ml dessa cultura a 100 ml de meio LB, suplementado com o respetivo antibiótico. Incubou-se a 37°C e 225 rpm, até que a cultura atingisse uma  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  de 0.4-0.5, e centrifugou-se durante 20 min, a 2772 g e 4°C. A partir desse momento o protocolo foi executado em gelo. O *pellet* foi ressuspenso e centrifugado durante 20 min, 2772 g e 4°C, por 3 vezes. Primeiro utilizando 30 ml, depois 20 ml e finalmente 10 ml de glicerol (10%). Após nova centrifugação, o *pellet* foi ressuspenso em 1 ml de glicerol (10%). Centrifugou-se durante 5 min, a 4°C e 9139 g. Por fim, o *pellet* foi ressuspenso em 250  $\mu\text{l}$  de glicerol (10%), fazendo-se alíquotas de 50  $\mu\text{l}$ , as quais foram guardadas a -80°C.

#### 2.2.1.2. Preparação de células competentes para transformação química

Para preparação de células DH5 $\alpha$  competentes, inoculou-se células desta estirpe em 100 ml de meio SOB suplementado com ampicilina a 100 mg/l e incubou-se a 18°C e 180 rpm, até se atingir a  $\text{DO}_{550\text{nm}}$  de 0.4-0.5. De seguida, incubou-se em gelo por 15 minutos, seguindo-se uma centrifugação durante 15 min, a 1386 rpm e 4°C. As células foram ressuspendidas em 5 ml de meio NZY e incubadas em gelo por 15 minutos. Adicionou-se 175  $\mu\text{l}$  de DMSO puro e incubou-se em gelo durante 10 minutos. A suspensão de células DH5 $\alpha$  competentes foi distribuída em alíquotas de 100  $\mu\text{l}$  e armazenou-se a -80°C.

### 2.2.2. Construção da estirpe DH5 $\alpha$ /pCW\_hPGRMC1

A construção desta estirpe ocorreu por transformação química. Misturou-se 50  $\mu\text{l}$  de células competentes DH5 $\alpha$  com 100 ng de plasmídeo pCW\_hPGRMC1 e incubou-se durante 30 minutos em gelo, seguido de um choque térmico de 30 segundos a 42°C e 2 minutos em gelo. Adicionou-se 1 ml de meio NZY às células transformadas e incubou-se durante 1h, a 210 rpm e 37°C, para recuperação celular. Seguidamente, as células foram inoculadas em placas LB, suplementadas com  $\text{Amp}^{100}$ , e incubadas a 37°C durante 16h. Após esta incubação, seis colónias foram selecionadas aleatoriamente e inoculadas em LB líquido, com o respetivo antibiótico, durante 16 h, a 220 rpm e 37°C. O volume das culturas foi utilizado para fazer stocks (100  $\mu\text{l}$ ; glicerol 10%) para serem guardados a -80°C.

### 2.2.3. Construção das estirpes BTC-CYP/PGRMC1

A expressão do complexo enzimático humano CYP/CPR/PGMRC1 em estirpes BTC-CYP (Duarte *et al.*, 2005) foi possível através de um sistema biplasmídico de co-expressão que compreende o vetor de expressão pCW (Tabela 2.1.4), que contém o gene de um CYP humano, e o plasmídeo pLCM\_hPGRMC1\_PORwt (Tabela 2.1.4), que codifica para as proteínas humanas PGRMC1 e CPR (Kranendonk *et al.*, 1998; Kranendonk *et al.*, 2008; Palma *et al.*, 2013). Este plasmídeo foi obtido a partir do vetor de expressão pLCM\_hb5\_POR (Tabela 2.1.4) (Palma *et al.*, 2013), substituindo a sequência codificante para o CYB5 humano pela sequência de cDNA *full-length* da PGRMC1 humana. O plasmídeo para expressão da CPR humana, pLCM\_PORwt e os plasmídeos de co-expressão das proteínas humanas CYP1A2 (pCWh1A2), CYP2A6 (pCWh2A6) e CYP3A4 (pCWh3A4), para construção das estirpes BTC-CYP, foram obtidos como descrito anteriormente (Tabela 2.1.4) (Kranendonk *et al.*, 1999, Kranendonk *et al.*, 2008).

#### 2.2.3.1. Transformação por eletroporação

A transformação das células competentes PD301 foi realizada com a adição de 100 ng de plasmídeo (Tabela 2.1.4) em 50 µl de suspensão de células eletrocompetentes. Posteriormente, a mistura foi incubada em gelo durante 5 min, transferida para uma cuvette de eletroporação e sujeita a 1.35 kV, 200 Ω e capacitância de 25 µFD. De seguida, as células foram transferidas para 900 ml de meio NZY<sup>+</sup> e incubadas por 1 hora, a 37°C e 220 rpm. Seguidamente, as células foram inoculadas em placas LB, suplementadas com ampicilina a 50 mg/l (A<sup>50</sup>), Canamicina a 15 mg/l (Kan<sup>15</sup>) e Cm<sup>10</sup>, e incubadas a 37°C durante 16h. Após esta incubação, seis colónias foram selecionadas aleatoriamente e inoculadas em LB líquido, com os respetivos antibióticos, durante 16 h, a 37°C e 220 rpm. Parte do volume das culturas foi utilizado para fazer stocks (glicerol 10%) para congelar a -80°C, enquanto que o restante volume foi utilizado para verificação das características fenotípicas.

#### 2.2.3.2. Eletroforese em gel de agarose

Os plasmídeos utilizados para eletroforese em gel de agarose foram obtidos através do kit GeneJet Plasmid Miniprep Kit (Tabela 2.1.1), que permite o isolamento do plasmídeo de interesse a partir de uma cultura bacteriana. As amostras foram preparadas numa concentração de 20 ng/µL em Loading Buffer 1x. O equipamento foi montado de acordo com as instruções do fabricante e o gel de agarose preparado numa concentração de 0.8% em tampão TAE 1x. A eletroforese decorreu a 80V durante 1h, em tampão TAE 1x. Após eletroforese, o gel foi corado numa solução de Gel Red 3x concentrada durante 20 minutos, e os resultados analisados (ChemiDoc™).



### 2.2.3.3. Verificação das características fenotípicas

Após eletroporação, foi necessário verificar a manutenção das características fenotípicas da estirpe PD301 nas células transformadas (Tabela 2.1.4), através do crescimento bacteriano em placas com meio mínimo M9 e em placas com meio MacConkey (Tabela 2.1.3). Para tal, as colónias transformadas foram incubadas com 5 ml de meio LB suplementado com os respetivos antibióticos em tubos de ensaio estéreis durante 16 h, a 37°C e 210 rpm. Para confirmar a auxotrofia à L-arginina, 5 µl de cultura foram inoculados em placas com meio mínimo M9, suplementado apenas com tiamina (1 µg/ml), incubadas durante 48h a 37°C. Como controlo, foi usado o mesmo tipo de placas, mas suplementado com L-arginina (100 µg/ml) e tiamina (1 µg/ml). Para verificar a manutenção da mutação do gene *rfa*, 5 µl de cultura foram inoculados em placas com meio MacConkey e, incubadas durante 36h a 37°C.

### 2.2.4. Culturas bacterianas das estirpes de *E. coli* com indução da expressão heteróloga

#### 2.2.4.1. Expressão das estirpes BTC-CYP e BTC-CYP/PGRMC1

Cada estirpe foi incubada em meio TB a pH 7.4, exceto as estirpes de expressão CYP3A4, as quais foram incubadas em meio TB com pH 6.8. Todos os meios foram suplementados com tiamina a 1 mg/l, Cm<sup>10</sup>, Amp<sup>50</sup>, Kan<sup>15</sup>, *trace elements* a 0.4 µl/ml, IPTG (indutor da expressão) a 0.5 mM e δ-Ala (percursor do grupo heme) a 0.65 mM. As culturas (100 ml) foram iniciadas com inóculos dos stocks (1 ml) (guardados previamente a -80°C), e incubadas em Erlenmeyer's de 1L, a 28°C, por 16 horas, numa incubadora orbital com agitação (180 rpm), condições de arejamento consideradas óptimas para co-expressão destas proteínas nestas estirpes (Campelo *et al.*, 2018; Esteves *et al.*, 2018).

#### 2.2.4.2. Expressão de PGRMC1

Um inóculo de 2.5 ml, de DH5α/pCW\_hPGRMC1 (secção 2.2.2), foi adicionado a um volume total de 500 ml de meio TB pH 7.4, o qual foi distribuído em porções iguais por quatro Erlenmeyer's de 1L. O meio foi suplementado com 0.4 µl/ml de *trace elements* e Amp<sup>100</sup> e incubado por aproximadamente 4h, a 37°C e 180 rpm. Quando a cultura atingiu o crescimento desejado (DO<sub>600</sub>=0.6), foi suplementada com 0,5 mM IPTG, 0,65 mM δ-Ala e Amp<sup>100</sup>. A incubação com indução de expressão de PGRMC1 deu-se por 48h, a 26°C e 130 rpm.

### 2.2.5. Estudo das frações membranares

#### 2.2.5.1. Preparação das frações membranares e sua caracterização

Para obtenção das frações membranares das células modelo, foi utilizado um protocolo previamente descrito (Kranendonk *et al.*, 2008, Moutinho *et al.*, 2012, Campelo *et al.*, 2017). De forma sucinta, as culturas induzidas foram centrifugadas a 2772 g durante 20 minutos a 4°C. O *pellet* foi ressuspenso em tampão Tris-sacarose (tampão ideal para estabilização de frações membranares) e adicionou-se lisozima (percursor da lise celular) a uma concentração final de 0.5 mg/ml, EDTA

(agente quelante) a 0.5mM, benzonase (endonuclease) a 12.5 U/ml e PMSF (inibidor de proteases) a 0.5 mM. As células foram incubadas num *roller bench* durante 30 minutos, a 4°C e 10 rpm. Para acelerar o processo de lise celular congelou-se as células a -80°C, aguardando-se uma hora. Posteriormente, a suspensão bacteriana foi descongelada à temperatura ambiente (em banho), e sonicada em 5 ciclos de 30 segundos (com 10% de *output*), intercalado com submersão em gelo durante 50 segundos, de modo a evitar degradação do conteúdo proteico por aumento excessivo da temperatura. A suspensão foi centrifugada a 2772 g, durante 20 minutos a 4°C para eliminar as células não lisadas. A fração membranar foi sedimentada por ultracentrifugação durante 1 hora, a 4°C e 100 000x g, tendo sido ressuspensa em tampão TGE, suavemente e em gelo, usando um homogeneizador com piston (*Potter*) (Tabela 2.1.2). As membranas foram armazenadas a -80°C.

#### **2.2.5.2. Determinação da concentração de proteína total**

A concentração de proteína total foi determinada através do método descrito por Bradford (Bradford, 1976), usando albumina sérica bovina [do inglês: *bovine serum albumin* (BSA)] como padrão. Para tal, uma curva de calibração foi preparada com BSA diluída em tampão TGE de forma a obter as concentrações de 0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mg/ml. As frações membranares foram diluídas entre 50 a 100 vezes em tampão TGE. De seguida, 10 µl de amostra e os respetivos padrões foram pipetados numa microplaca de 96 poços (transparente, com poços de formato cilíndrico e fundo achatado) (Tabela 2.1.2), juntou-se 200 µl de reagente de Bradford, diluído 5x e incubou-se durante 15 minutos, no escuro. Os valores de absorbância foram medidos num leitor de microplacas (SpectraMax® i3x, Molecular Devices), num comprimento de onda de 595 nm e a concentração de proteína total das amostras foi determinada através da interpolação da curva de calibração.

#### **2.2.5.3. Determinação da concentração de citocromo P450**

O doseamento dos CYPs foi efetuado através da observação do espectro diferencial de CYP reduzido complexado com monóxido de carbono (CO) versus CYP reduzido, conforme descrito por Omura e Sato (Omura and Sato, 1964) e com as modificações descritas por Kranendonk *et al.*, 1999. As frações membranares obtidas em 2.2.5.1, foram diluídas 18 vezes em tampão TGE, num volume final de 1.8 ml. Adicionou-se ditionito de sódio numa concentração final de 4.6 mM, de forma a reduzir todo o CYP presente. As amostras foram divididas em duas cuvettes e traçou-se a linha de base entre os 400 e 500 nm. Borbulhou-se a cuvette da amostra com CO, durante 30 segundos, de modo a saturar a mistura com CO, e traçou-se o espectro diferencial entre os 400 e os 500 nm. Tendo em conta o máximo de absorbância e conhecendo o coeficiente de absorvidade molar do complexo CYP-CO ( $\epsilon = 91 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ), foi então possível calcular a concentração de CYP.

#### 2.2.5.4. Determinação da concentração de CPR pelo ensaio do citocromo *c*

Este método baseia-se na capacidade da CPR em reduzir um substrato não fisiológico, o citocromo *c* (Kranendonk *et al.*, 2008). Esta reação é acompanhada ao longo de 1 minuto, por aumento da absorbância da mistura, num comprimento de onda de 550 nm. Em primeiro lugar, preparou-se uma mistura de 1920 µl de tampão citocromo *c* redutase, 50 µl de solução de citocromo *c* a 50 µM e 20 µl de fração membranas diluída 4x. A mistura foi dividida em duas *cuvettes*, sendo que uma das *cuvettes* corresponde à amostra e a outra à referência. A reação inicia-se pela adição de 2 µl de NADPH na *cuvette* de amostra (solução 200 µM preparado em NaHCO<sub>3</sub> 1%). A concentração de CPR foi determinada utilizando um  $\Delta\epsilon_{550\text{nm}} = 21 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  e sabendo que a atividade enzimática para a redução do citocromo *c* é de 3.2 µmol.min<sup>-1</sup>. Com a concentração proteica da amostra calculou-se o conteúdo de CPR nas frações membranares (Campelo *et al.*, 2017)

#### 2.2.6. Purificação de PGRMC1

A preparação da fração membranas para purificação de PGRMC1, decorreu da mesma forma como descrito em 2.2.5.1, com exceção do passo de ressuspensão, o qual foi efetuado com adição de tampão fosfato de sódio, tal como especificado pelo fabricante das resinas de troca iónica utilizadas [HisPur Cobalt Resin (Fração B3) e His GraviTrap TALON® (Fração F4)]. Para solubilizar as frações membranares, adicionou-se CHAPS (Fração B3) ou Triton X-100 (Fração F4) numa concentração final de 1%, numa frequência de 1 gota por cada 5 segundos. Em seguida, a mistura foi incubada em gelo por aproximadamente 2h, com agitação suave. O material insolúvel foi removido por ultracentrifugação durante 1h, a 100 000x g e 4°C. No procedimento de cromatografia IMAC (do inglês: *immobilized metal affinity chromatography*) o sobrenadante foi diluído em tampão fosfato de sódio e aplicado na resina, equilibrada com 10 volumes de coluna de tampão fosfato de sódio 50 mM, suplementado com 300 mM de NaCl. Após mistura da resina com a suspensão proteica, esta foi incubada durante 2h em gelo e, em seguida, lavada com 10 volumes de coluna de tampão fosfato de sódio 50 mM, suplementado com 300 mM NaCl e 10 mM imidazole, para eliminação de proteínas contaminantes. A proteína de interesse foi posteriormente eluída no mesmo tampão, mas suplementado com 150 mM de imidazole. A caracterização das frações de proteína purificada (Frações B3 e F4) foram realizadas conforme os protocolos descritos em 2.2.5.2 e por imunodeteção (Ver 2.2.7).

#### 2.2.7. Imunodeteção de PGRMC1 expressa nas estirpes em estudo

O ensaio de imunodeteção foi realizado seguindo o protocolo de Western Blot (Sambrook, Fritsch and Maniatis, 1989). As amostras foram preparadas em Loading Buffer 5x e misturadas numa porção de 1:2 ou 1:5 (dependendo da concentração pretendida) e, depois fervidas (desnaturadas) durante 5 minutos a 96°C. O equipamento para eletroforese (Tabela 2.1.2) foi montado de acordo com as instruções do fabricante e foram utilizados géis comerciais Mini-Protean® TGX™ Precast Gel

(Tabela 2.1.1), que possuem um gradiente de concentração de 4% a 15% de acrilamida. Para a eletroforese, foi utilizado tampão corrida 1x (Tabela 2.1.3). A eletroforese decorreu a 100V, 20 mA durante 1h30m. Foi utilizada uma membrana de PVDF (fluoreto de polivinilideno) para transferência eletroforética, que decorreu durante 1h, a 100V, em tampão transferência 1x (Tabela 2.1.3). Para imunodeteção de proteínas foi utilizado o kit WesternDot 625 (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante. Como primeiro anticorpo foi utilizado um anticorpo policlonal anti-PGRMC1 (*rabbit*), como anticorpo secundário um anticorpo anti-*rabbit* conjugado com biotina como substrato, streptavidina. Após as membranas serem fotografadas, as quantidades de PGRMC1 nas amostras em estudo foram calculadas recorrendo ao *software* ImageJ.

## 2.2.8. Avaliação da atividade catalítica dos CYPs

### 2.2.8.1. Estudo da integração da PGRMC1 em membranas BTC-CYP

Este ensaio teve como objetivo determinar o tempo necessário de incubação, para integração da PGRMC1 em membranas BTC-CYP. O ensaio foi realizado à temperatura ambiente e em microplaca, medindo-se a velocidade de reação da O-desbenzilação da dibenzilfluoresceína (DBF) pela fração membrana BTC-CYP3A4, numa concentração final por poço de 25 nM de CYP3A4 e 7.5  $\mu$ M de DBF. Utilizou-se PGRMC1 purificada (fração F4) numa concentração final por poço de 5.2  $\mu$ M, durante 0, 15, 30, 45, 60, 120 e 180 minutos. Como sistema regenerador de eletrões utilizou-se uma solução contendo NADP<sup>+</sup> numa concentração final de 2 mM, G-6-P numa concentração de 4 mM e G-6-PD a 0,4 U/ml. As medições, feitas em triplicado, foram realizadas numa microplaca de 96 poços (opaca de cor preta, poços de formato cilíndrico e fundo achatado) (Tabela 2.1.2).

### 2.2.8.2. Efeito da PGRMC1 em membranas BTC-CYP

Avaliou-se a atividade catalítica dos CYP1A2, 2A6 e 3A4, expressos em modelos de co-expressão BTC-CYP e BTC-CYP/PGRMC1 (Tabela 2.1.4). Esta abordagem baseou-se em ensaios de medição de fluorescência, utilizando a incubação de frações membranares com substratos fluorogénicos, o que permite determinar as velocidades de reação da O-desetilação da 7-etoxiresorufina (EthR) para o CYP1A2, da 7-hidroxilação da cumarina para o CYP2A6 e da O-desbenzilação da DBF para o CYP3A4 (Duarte *et al.*, 2005; Moutinho *et al.*, 2012; Campelo *et al.*, 2018; Esteves *et al.*, 2018).

Este ensaio teve como objetivo determinar que tipo de efeito exerce a PGRMC1 no complexo CYP. Mais precisamente, se a PGRMC1 tem a capacidade de estimulação ou inibição nas diferentes isoformas de CYP em estudo (CYP1A2, CYP2A6 e CYP3A4). Como tal, usaram-se concentrações finais de PGRMC1 purificada (fração B3) de 0, 44.7, 149, 447, 1490, 4470, 14900 e 44700 nM. Por poço, utilizou-se uma concentração final de fração membrana de 8 nM de CYP1A2 e 5  $\mu$ M de EthR, ou 25 nM de CYP2A6 e 20  $\mu$ M de cumarina, ou 25 nM de CYP33A4 e 7,5  $\mu$ M de DBF. As medições,

feitas em triplicado (quando possível), foram realizadas em microplacas opacas de 96 poços (Tabela 2.1.2), e a leitura feita no leitor de microplacas (Tabela 2.1.2) após incubação de 1h, à temperatura ambiente.

### **2.2.8.3. Ensaios de competição entre PGRMC1 e CYB5**

Este ensaio teve como objetivo determinar se existe competição pelo CYP entre a PGRMC1 e o CYB5, com base no domínio heme, estruturalmente semelhante em ambas as proteínas. Como tal, utilizaram-se frações membranares BTC-CYP/PGRMC1 co-expressas com as diferentes isoformas de CYP (CYP1A2, 2A6 e 3A4). As medições realizadas tiveram como base o mesmo procedimento supracitado (2.2.8.2), com a diferença de que a concentração final no poço, para a fração membranar CYP2A6 foi de 100 nM. O CYB5 purificado foi fornecido pelo laboratório parceiro LISBP, Université de Toulouse, CNRS, INRA, INSA de Toulouse. As concentrações finais de CYB5 por poço foram de 0, 12.5, 25, 50, 100, 200, 400 e 800 nM. As medições realizadas tiveram por base as condições descritas anteriormente. Como referência utilizou-se a mesma reação, mas com membrana CYP\_CPR. Como controlo utilizou-se BSA, nas mesmas concentrações de CYB5, de modo a demonstrar que os resultados observados seriam dependentes da ação do CYB5 e não do aumento da concentração de proteína total em solução.

De forma a estudar melhor a competição entre ambas as proteínas, realizou-se outro ensaio, no qual se variaram as concentrações finais de CYB5 e PGRMC1, tendo como base os procedimentos descritos em 2.2.8.2.

### **2.2.9. Ensaio de redução da PGRMC1 pela CPR**

Este método baseia-se na hipótese de que é possível haver redução da PGRMC1 pela CPR, devido ao grupo heme da PGRMC1 se poder apresentar nos estados ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) e férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) (Kabe *et al.*, 2016; Kaluka *et al.*, 2015) e ainda, devido à co-localização de ambas as proteínas (retículo endoplasmático). A reação foi acompanhada ao longo de 30 minutos, com obtenção de espectros (1 espectro/min) em comprimentos de onda entre 380 e 620 nm. Em primeiro lugar, preparou-se uma mistura de 5 mg/ml de proteína total da fração membranar CPR, obtida da estirpe PD301/pLCM\_POR (Tabela 2.1.4) com concentração final de CPR a 50 nM e fração membranar PGRMC1, obtida da estirpe DH5 $\alpha$ /pCW\_hPGMRC1 (Tabela 2.1.4) também preparada a 5 mg/ml de proteína, com concentração final de PGRMC1 a 9  $\mu\text{M}$ . A esta mistura adicionou-se 100  $\mu\text{l}$  de sistema regenerador 5x concentrado, com concentrações finais de  $\text{NADP}^+$  10mM, G-6-P 25 mM e G-6-PD 2 U/ml. O ensaio realizado no espectrofotómetro de feixe duplo, teve como referência a fração membranar CPR, preparada a 5 mg/ml de proteína total e com concentração de 100 nM, ao qual se adicionou sistema regenerador 5x. Como controlo utilizou-se uma mistura de fração membranar BTC°, obtida da estirpe PD301/pLCM/pCWori (Tabela 2.1.4), preparada a uma concentração de 5 mg/ml de

proteína total e de fração membranar CPR, preparada a 5 mg/ml, cuja reação foi seguida durante o mesmo tempo e nas mesmas condições descritas anteriormente.

Ainda, utilizando uma fração membranar PGRMC1 a 5 mg/ml de proteína total, traçou-se o espectro diferencial da membrana reduzida. A fração membranar obtida em 2.2.5.1, preparada num volume final de 1.8 ml foi dividida em duas *cuvettes*. Deste modo, obteve-se a *baseline* e de seguida, de forma a reduzir a PGRMC1 presente, adicionou-se ditionito de sódio numa concentração final de 4.6 mM à *cuvette* de amostra. Por fim, traçou-se o espectro diferencial entre os comprimentos de onda 380 e 620 nm, ao fim de 20 minutos de incubação.

### **3. RESULTADOS**





### 3.1. Construção das estirpes BTC-CYP/PGRMC1

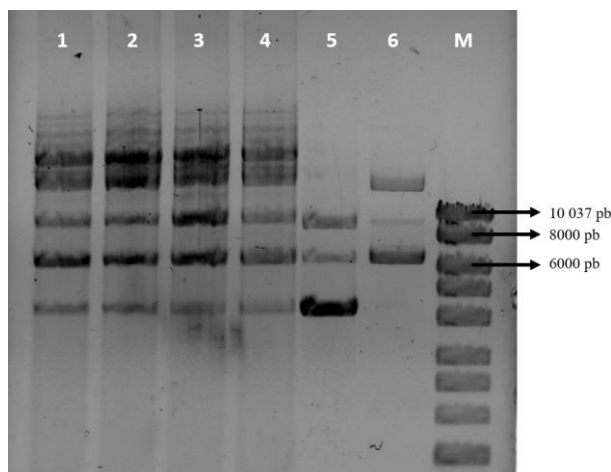
A primeira parte do trabalho experimental focou-se no desenvolvimento de um sistema bacteriano de *E. coli* competente na expressão das proteínas CYP, CPR e PGRMC1, para ser aplicado no estudo do efeito da PGRMC1 na atividade catalítica dos CYPs. O primeiro passo na construção deste modelo de co-expressão (Tabela 2.1.4) foi a preparação de células PD301/pCWh\_CYP competentes para eletroporação de acordo com o descrito na secção 2.2.3.1. Assim, células PD301, previamente transformadas com pCW\_hCYP, nomeadamente pCWh\_1A2, pCWh\_2A6 e pCWh\_3A4, foram preparadas para eletroporação, procedendo-se à sua transformação com o plasmídeo pLCM\_hPGRMC1\_POR, obtendo-se deste modo três novas estirpes, referenciadas na Tabela 2.1.4. Posteriormente estas estirpes foram utilizadas no processo de obtenção de frações membranares para o estudo da atividade dos CYPs.

#### 3.1.1. Verificação das características fenotípicas

Colónias transformadas, resultantes do processo de eletroporação, foram selecionadas e posteriormente testadas de modo a verificar a manutenção das características fenotípicas. Para tal, utilizou-se a técnica de crescimento em meio mínimo (M9) sem L-arginina com o objetivo de testar a reversão de mutação no gene responsável pela síntese de arginina (*argE3*, Tabela 5). Assim, todos os transformantes apresentaram auxotrofia para L-arginina, verificada pelo crescimento em placas com L-arginina (A+) e ausência de crescimento em placas sem este aminoácido (A-). O teste em placas MacConkey permitiu verificar a presença de revertentes para mutação no gene *rfa*. Nestas placas, a ausência de crescimento permitiu concluir que não existiam revertentes entre as colónias selecionadas. O gene *rfa* está associado à síntese de lipopolissacáridos da parede celular. A mutação presente nas estirpes BTC leva a uma síntese deficiente de lipopolissacáridos e à produção de uma parede celular mais fina, havendo uma maior permeabilidade celular, permitindo a entrada de químicos com maiores dimensões, facilitando a realização de ensaios de mutagenicidade e cinética enzimática de CYPs (Ames *et al.*, 1973). Assim, em todas as colónias transformantes foi confirmada a deficiência na parede lipopolissacárida (LPS<sup>d</sup>), pela ausência de crescimento em meio MacConkey.

#### 3.1.2. Análise do DNA plasmídico

Para cada estirpe, o conteúdo de DNA plasmídico foi extraído e posteriormente analisado por eletroforese em gel de agarose, de modo a confirmar a presença dos vetores de expressão. Deste modo, foi possível verificar a existência de bandas correspondentes a pCWh\_1A2 (6916 pb), pCWh\_2A6 (6594 pb), pCWh\_3A4 (65539 pb) e pLCM\_hPGRMC1\_POR (9905 pb). Na Figura 3.2 está representado um exemplo dos resultados obtidos para os plasmídeos pCWh1A2 + pLCM\_hPGRMC1/POR, extraído da estirpe BTC1A2\_PGRMC1.



**Figura 3.2:** Análise eletroforética em gel de agarose 0.8%. As amostras de DNA plasmídico pertencem a diferentes colónias transformantes de BTC1A2\_PGRMC1. (1-4: pCWh1A2 + pLCM\_hPGRMC1/POR; 5: pCWh1A2 (controle); 6: pLCM\_hPGRMC1 (controle); M: Marcador HypperLadder I)

No que concerne à estirpe BTC1A2\_PGRMC1, em todos os transformantes é possível observar as bandas correspondentes aos dois plasmídeos de interesse. Resultados semelhantes também foram observados para as restantes estirpes.

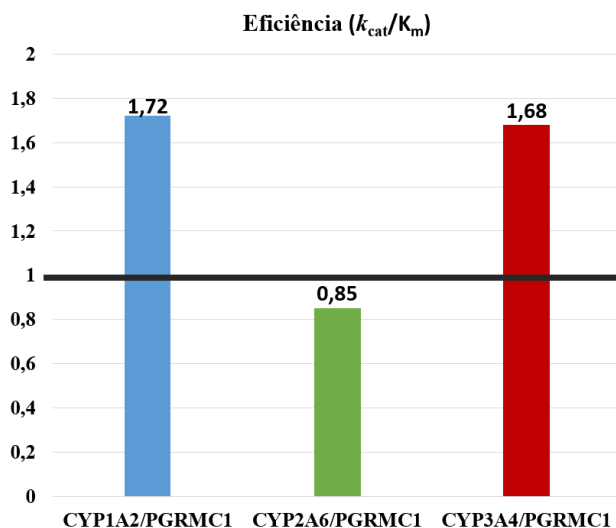
### 3.2. Análise preliminar

Esta primeira abordagem consistiu num ensaio preliminar à realização da presente dissertação, com o objetivo de estudar, através do modelo experimental proposto, a capacidade da PGRMC1 em interagir com o complexo CYP e qual o efeito dessa interação na atividade do complexo. Compararam-se os parâmetros cinéticos das diferentes isoformas CYP em estudo, na presença ou ausência de PGRMC1 (Tabela 3.1, Figura 3.1), em frações membranares com co-expressão de CYP, CPR e, opcionalmente de PGRMC1.

**Tabela 3.1:** Parâmetros cinéticos das atividades das diferentes formas de CYP

Estirpes BTC	$k_{cat}^a$ <i>produto formado</i>	$K_m$ $\mu M$	$R^2$	Eficiência ( $k_{cat}/K_m$ ) (%) <sup>*</sup>
CYP1A2	$0.57 \pm 0.02$	$0.99 \pm 0.10$	0.98	0.58 (100)
CYP1A2/PGRMC1	$0.64 \pm 0.01$	$0.65 \pm 0.07$	0.97	0.99 ( <b>172</b> )
CYP2A6	$1.33 \pm 0.05$	$1.56 \pm 0.22$	0.98	0.85 (100)
CYP2A6/PGRMC1	$1.43 \pm 0.07$	$2.00 \pm 0.37$	0.96	0.72 ( <b>85</b> )
CYP3A4	$0.22 \pm 0.01$	$1.42 \pm 0.20$	0.97	0.15 (100)
CYP3A4/PGRMC1	$0.12 \pm 0.01$	$0.46 \pm 0.08$	0.95	0.26 ( <b>168</b> )

<sup>\*</sup>o cálculo do aumento ou diminuição da eficiência em percentagem (%) foi feito em relação aos valores obtidos pela mesma isoforma de CYP sem a presença de PGRMC1

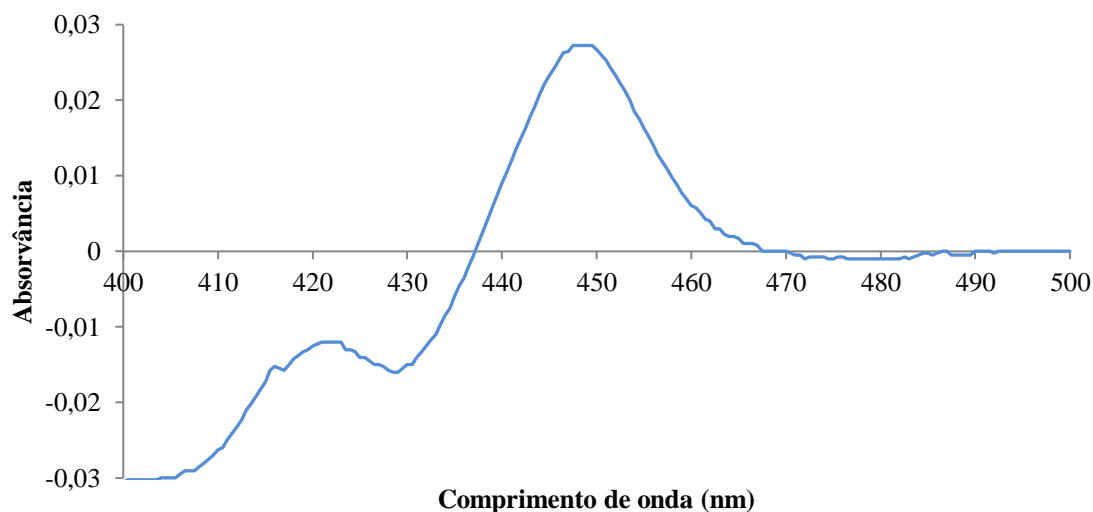


**Figura 3.1:** Eficiência normalizada expressa como  $k_{cat}/K_m$ , comparando as isoformas de CYP quando sustentada por CPR na presença de PGRMC1.

Verificou-se que a PGRMC1 tem a capacidade de interagir com o complexo enzimático CYP, com um efeito estimulatório na atividade dos CYP1A2 e 3A4 e, por outro lado, um efeito inibitório relativamente ao CYP2A6.

### 3.3. Caracterização das frações membranares e determinação dos conteúdos proteicos

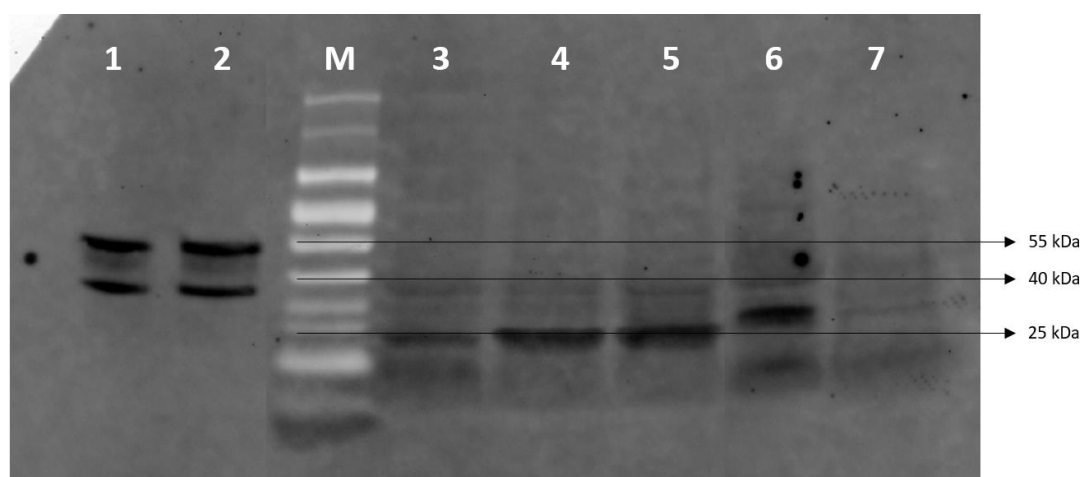
A quantificação de CYP nas frações membranares, foi efetuada pelo método de espectrofotometria diferencial entre a forma reduzida e a forma reduzida complexada com CO, com a deteção de um pico característico, perto dos 450 nm, (Omura and Sato, 1964), tal como descrito na secção 3.2. dos métodos. Como exemplo desta avaliação, o espectro diferencial (Figura 3.3) de um dos candidatos, das colónias transformantes, da estirpe BTC1A2\_PGRMC1, é apresentado em seguida. Os níveis de CYP foram determinados de acordo com o descrito em 2.2.5.3.



**Figura 3.3:** Espectro diferencial do CYP1A2 nos comprimentos de onda entre 400 e 500nm (CYP reduzido complexado com monóxido de carbono vs CYP reduzido) na estirpe BTC1A2\_PGRMC1.

O conteúdo de CPR nas frações membranares foi determinado através do ensaio de redução do citocromo *c*, tal como descrito na secção 2.2.5.4. Os resultados encontram-se descritos na Tabela 3.2.

O nível de expressão de PGRMC1 nas frações membranares das diferentes estirpes BTC e DH5 $\alpha$  (Tabela 3.2) foram estimadas por imunodeteção (Figura 3.4), utilizando quantidades padrão de PGRMC1 purificada. Para cada amostra foram carregados 20  $\mu$ g de proteína total. A quantificação dos níveis de expressão de PGRMC1 foi efetuada recorrendo-se às ferramentas analíticas do *software* ImageJ, de acordo com o descrito na secção 2.2.7.



**Figura 3.4:** Fotografia da membrana de imunodeteção de PGRMC1 nas frações membranares isoladas a partir de culturas induzidas das estirpes BTC-CYP\_PGRMC1/CPR. (1: 100 ng de PGRMC1 purificada de origem comercial (padrão); 2: 125 ng de PGRMC1 purificada de origem comercial (padrão); 3: fração membranares da estirpe BTC1A2\_PGRMC1/POR; 4: fração membranares da estirpe BTC2A6\_PGRMC1/POR; 5: fração membranares da estirpe BTC3A4\_PGRMC1/POR; 6: fração membranares de PGRMC1; 7: Fração membranares da estirpe BTC° (controlo); M: Marcador PageRuller 26616)

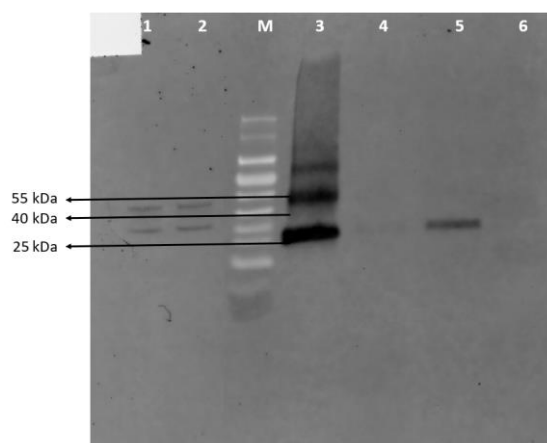
As diferentes estirpes foram caracterizadas quanto aos conteúdos relativos de CYP, CPR e PGRMC1, tendo como finalidade as frações membranares relativamente aos rácios CYP/CPR, CYP/PGRMC1 e CPR/PGRMC1 (Tabela 3.2).

**Tabela 3.2:** Conteúdos das frações membranares, relativamente ao CYP e CPR e respetivo rácio (CPR:CYP)

Estirpes BTC	CYP nM	CPR nM	PGRMC1 $\mu$ M	CPR:CYP	CYP:PGRMC1	CPR:PGRMC1
CYP1A2	595 $\pm$ 12	46 $\pm$ 3.0	-----	1:13	-----	-----
CYP1A2_PGRMC1	615 $\pm$ 0.4	109 $\pm$ 0.1	108	1:6	1:175	1:990
CYP2A6	1126 $\pm$ 17	158 $\pm$ 0.4	-----	1:7	-----	-----
CYP2A6_PGRMC1	915 $\pm$ 0.9	94 $\pm$ 0.1	146	1:10	1:160	1:1553
CYP3A4	855 $\pm$ 21	208 $\pm$ 0.1	-----	1:4	-----	-----
CYP3A4_PGRMC1	709 $\pm$ 1.4	323 $\pm$ 0.8	170	1:2	1:241	1:529
PGRMC1	-----	-----	171	-----	-----	-----

### 3.4. Isolamento e análise das frações purificadas de PGRMC1

Para purificar a proteína PGRMC1 foram necessários vários ensaios, principalmente devido a condições de otimização. Em primeiro lugar, recorreu-se a colunas de purificação de resina IMAC com cobalto (Talon HisTrap), onde se seguiram os procedimentos fornecidos pelo fabricante. A partir deste isolamento obteve-se a fração denominada F4. Num passo seguinte, utilizou-se outra resina IMAC (HisPur cobalto resin), com a qual se obteve a fração denominada B3 (Figura 3.5). A diferença na obtenção destas duas frações, para além da resina, foi o detergente utilizado no passo de solubilização da proteína durante a purificação. Assim, enquanto que a fração B3 foi sujeita a solubilização com o detergente CHAPS, a fração F4 foi tratada com o detergente Triton. A quantidade de PGRMC1 nas frações purificadas foram estimadas por imunodeteção, utilizando quantidades padrão de PGRMC1 purificada, de acordo com o descrito em 2.2.6. A quantidade de PGRMC1 foi calculada recorrendo às ferramentas analíticas do *software* ImageJ (Figura 3.5).



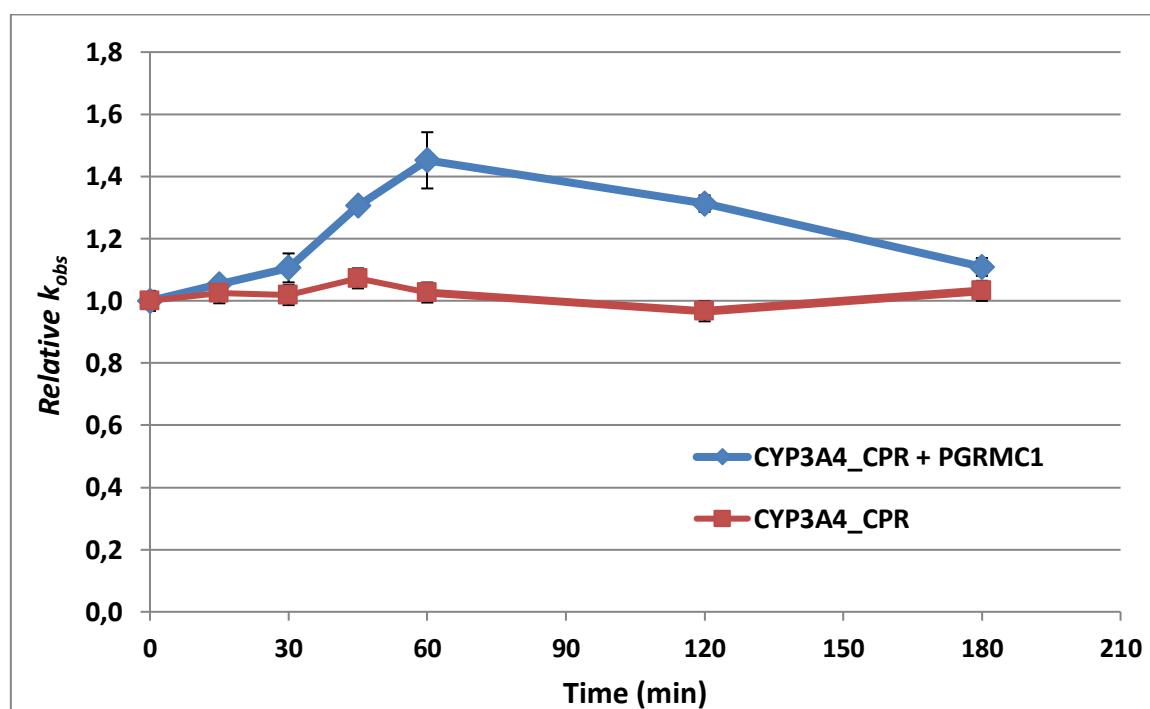
**Figura 3.5:** Figura da membrana de imunodeteção da PGRMC1 com as frações purificadas de PGRMC1. (1: 100 ng de PGRMC1 purificada de origem comercial (padrão); 2: 125 ng de PGRMC1 purificada de origem comercial (padrão); 3: fração purificada F4; 4: BTC° (controlo); 5: fração purificada B3; 6: BTC° (controlo); M: Marcador PageRuler 26616)

É possível observar no poço 3 (Figura 3.5) a fração purificada F4, evidenciando duas bandas salientes, uma na zona dos 25 kDa e outra aproximadamente nos 55 kDa, revelando a existência de proteína na forma de monómero e de dímero. No processo de purificação da fração B3 (poço 5), observou-se que o *pellet* da fração membranar tinha cor vermelha (Anexo 1), característico de proteínas heme. Após solubilização, foi notória a perda dessa cor para uma cor acastanhada, sugerindo que houve perda relativa do grupo heme. Ainda, é evidente uma única banda na zona dos 25 kDa, concluindo-se que esta fração (B3) é maioritariamente proteína na forma de monómero. As quantidades de PGRMC1 determinadas foram de 3449  $\mu$ M e 723  $\mu$ M para as frações F4 e B3, respetivamente.

### 3.5. Avaliação do efeito da PGRMC1 na atividade do complexo CYP

#### 3.5.1. Estudo da integração da PGRMC1 em membranas BTC-CYP

Este ensaio teve como finalidade avaliar o tempo necessário para que a PGRMC1 tenha uma integração óptima na membrana BTC-CYP. Foi utilizada a fração membranar CYP3A4 co-expressa com CPR, em conjunto com uma fração purificada de PGRMC1 (F4), de acordo com o descrito na secção 2.2.8.1. Segue-se o gráfico com o resultado obtido (Figura 3.6).

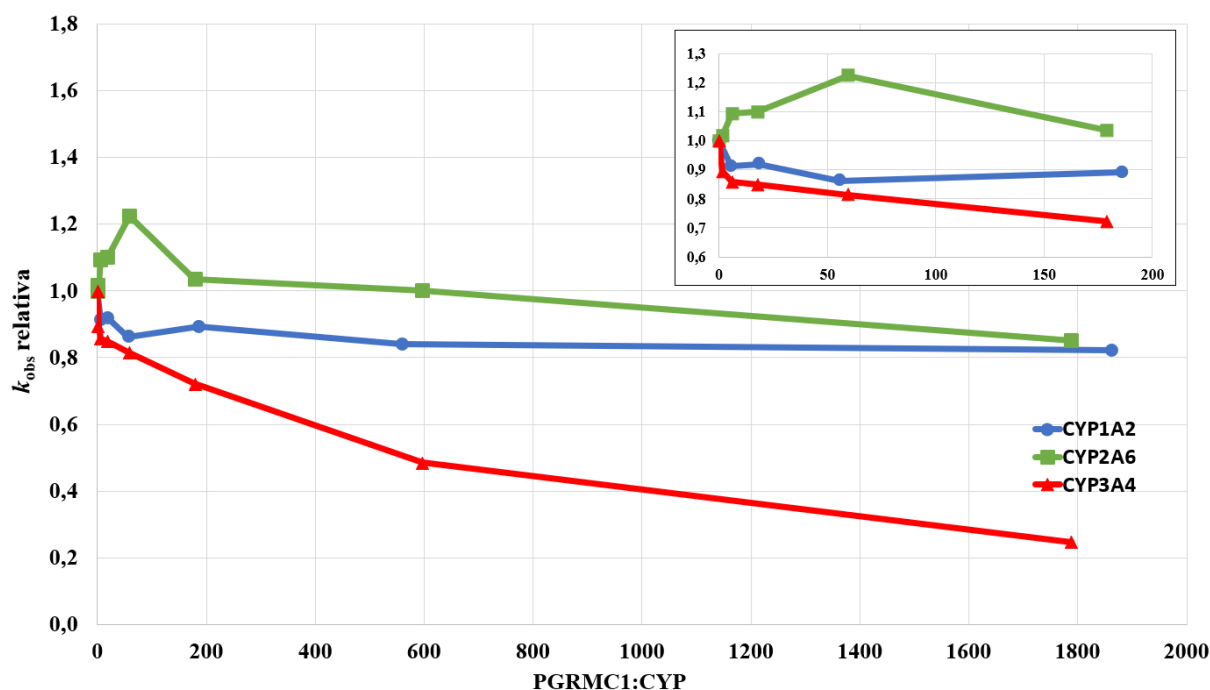


**Figura 3.6:** Representação gráfica da velocidade ( $k_{obs}$ ) de reação da O-desbenzilação da DBF metabolizada pelo CYP3A4 em função do tempo, para a fração membranar da estirpe BTC3A4 com PGRMC1 (fração F4) (azul), utilizando como controlo (vermelho) a mesma fração, mas sem adição de fração purificada de PGRMC1.

A partir deste ensaio, foi possível determinar que o tempo de incubação óptimo para integração da PGRMC1 na membrana é de 60 minutos, à temperatura ambiente. Ainda, ficou evidenciado que aos 60 minutos existe um efeito estimulatório da PGRMC1 na atividade do CYP3A4 (Figura 3.6), tal como observado anteriormente, nos estudos preliminares (Figura 3.1).

### 3.5.2. Efeito da PRGMC1 na atividade dos CYPs em membranas BTC-CYP

Com a finalidade de avaliar o efeito da PGRMC1 na atividade catalítica dos CYPs, foram usadas frações membranares das estirpes BTC-CYP e uma fração purificada da PGRMC1 (fração B3) (Figura 3.7).

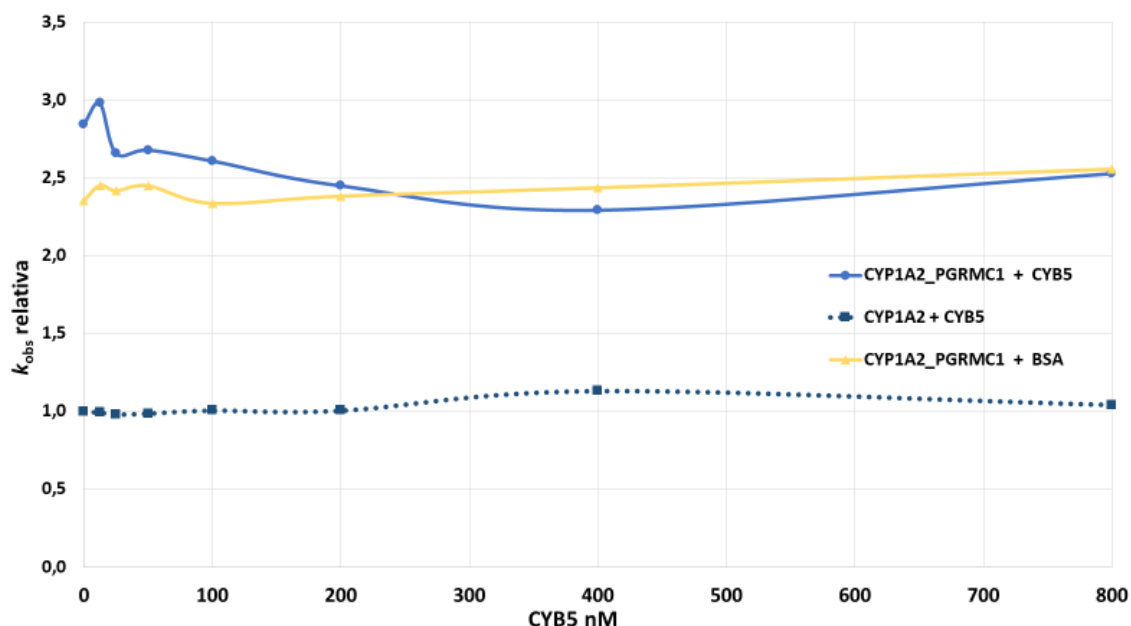


**Figura 3.7:** Representação gráfica da velocidade de reação ( $k_{obs}$ ) da O-desetilação da EthR para o CYP1A2, da 7-hidroxilação da cumarina para o CYP2A6 e da O-desbenzilação da DBF para o CYP3A4 de CYP em função da estequiometria PGRMC1:CYP, para as frações membranares das estirpes BTC1A2 (azul), BTC2A6 (verde) e BTC3A4 (vermelho), respetivamente

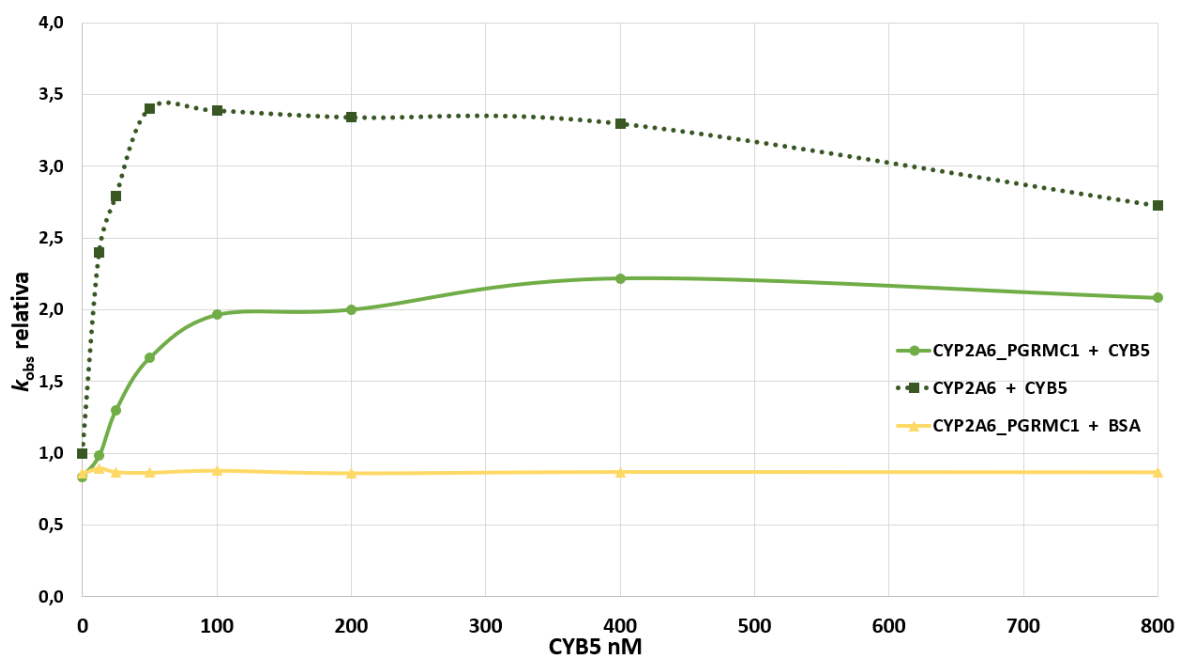
Neste ensaio foi possível observar que existe interação entre a PGRMC1 (fração B3) e os CYPs em estudo. Verificou-se que a atividade dos CYP1A2 e 3A4 diminui, conforme o aumento da concentração de PGRMC1, sendo que este fenómeno foi mais acentuado para o CYP3A4. Já o CYP2A6 apresentou uma ligeira estimulação em concentrações mais baixas de PGRMC1, sendo inibido em concentrações mais elevadas. É de notar que quanto maior a razão estequiométrica entre a PGRMC1 e o CYP, maior o efeito inibitório.

### 3.5.3. Ensaio de competição entre a PGRMC1 e o CYB5

Este ensaio teve como fundamento a possível competição entre a PGRMC1 e CYB5 para ligação ao CYP, que poderá ocorrer devido aos domínios heme serem semelhantes em ambas as enzimas. Para tal, foram utilizadas frações membranares de co-expressão CYP\_PGRMC1/POR e uma fração purificada de CYB5 (Figuras 3.8, 3.9 e 3.10).

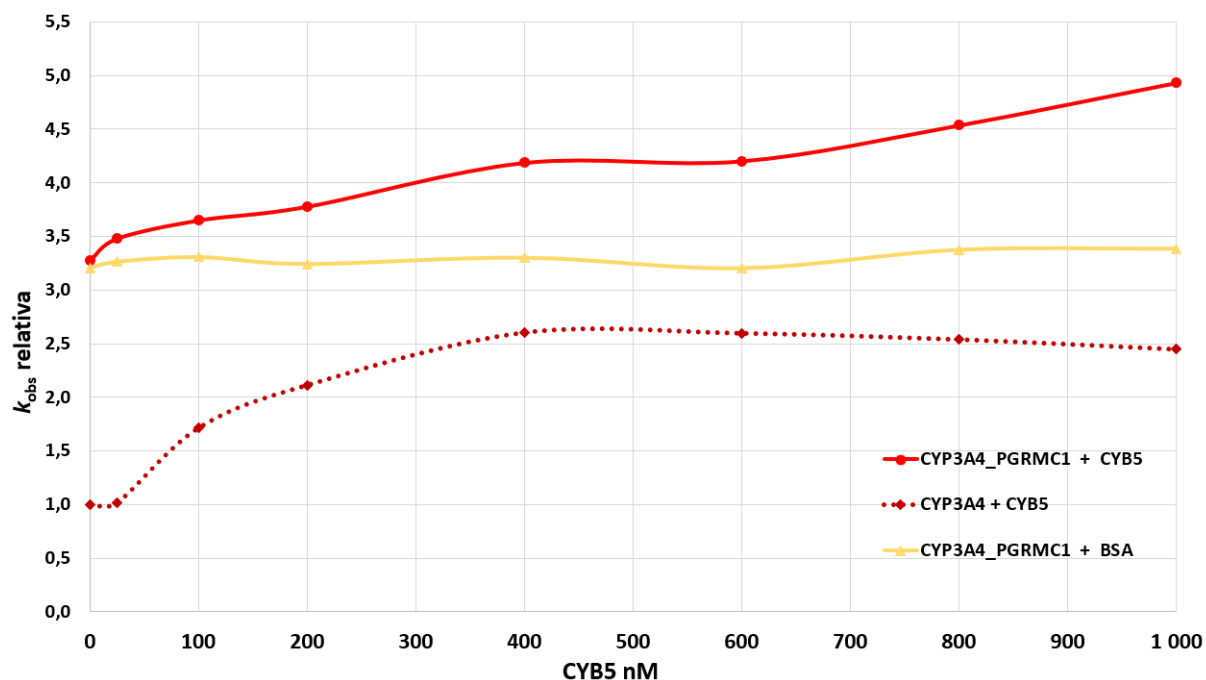


**Figura 3.8.:** Representação gráfica da velocidade de reação ( $k_{obs}$ ) da O-desetilação da EthR para o CYP1A2 em função de concentrações crescentes de CYB5 purificado, para as frações membranares das estirpes BTC1A2\_PGRMC1 (azul), BTC1A2 (azul tracejado) e controlo em função de concentrações crescentes de BSA (amarelo)



**Figura 3.9:** Representação gráfica da velocidade de reação ( $k_{obs}$ ) da 7-hidroxilação da cumarina para o CYP2A6 em função de concentrações crescentes de CYB5 purificado, para as frações membranares das estirpes BTC2A6\_PGRMC1 (verde), BTC2A6 (verde tracejado) e controlo em função de concentrações crescentes de BSA (amarelo).

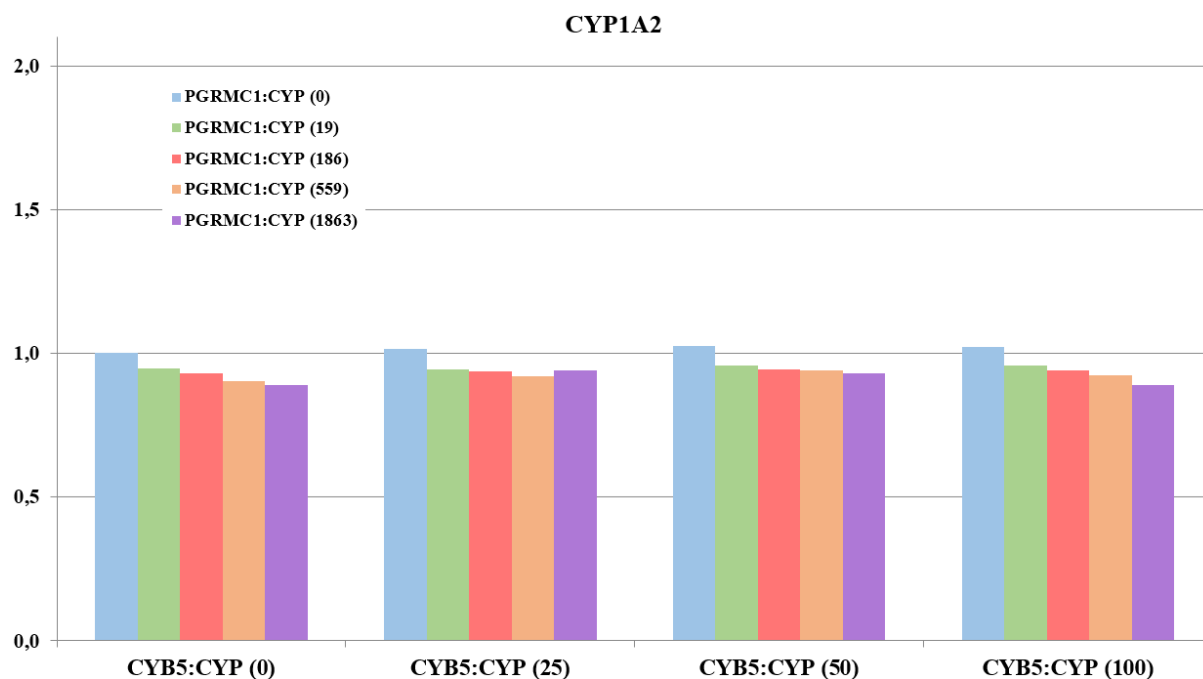




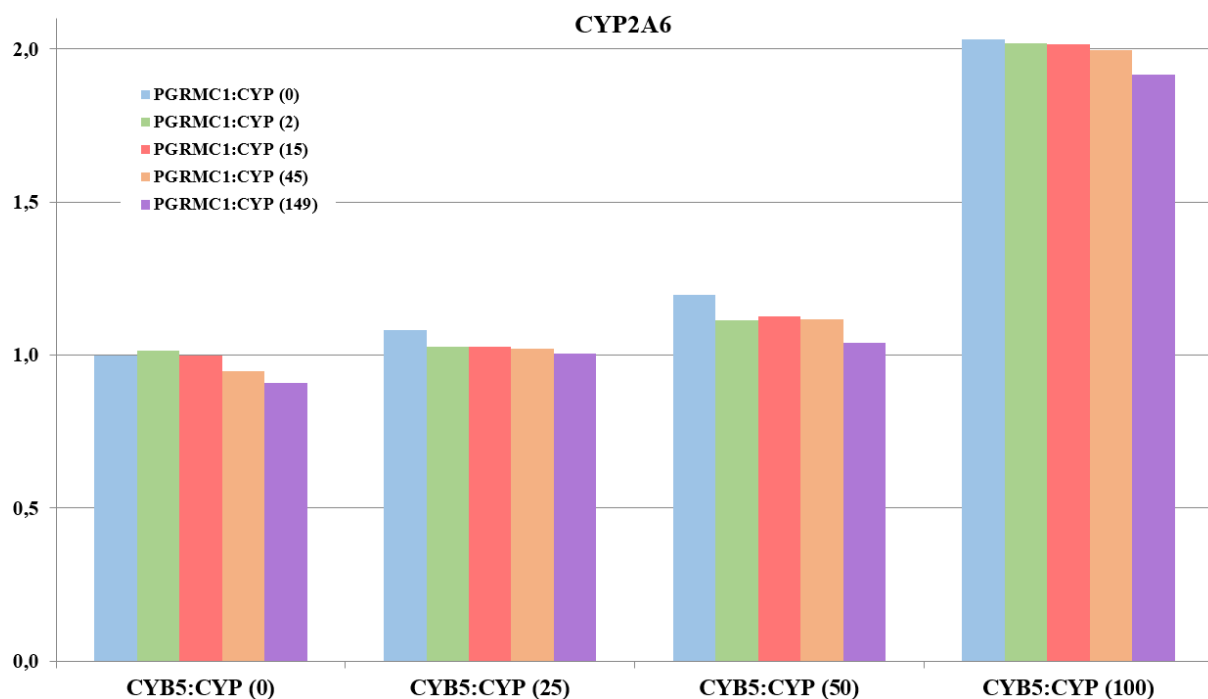
**Figura 3.10:** Representação gráfica da velocidade de reação ( $k_{obs}$ ) da O-desbenzilação da DBF para o CYP3A4 em função de concentrações crescentes de CYB5 purificado, para as frações membranares das estirpes BTC3A4\_PGRMC1 (vermelho), BTC3A4 (vermelho tracejado) e controlo em função de concentrações crescentes de BSA (amarelo)

A partir destes ensaios foi possível observar que existe um efeito competitivo entre a PGRMC1 e o CYB5, indicando que competem pelo local de ligação ao CYP. Ainda, foi possível observar que a BSA não produz um efeito na atividade dos CYPs em estudo, concluindo-se que o efeito observado é devido à interação entre as proteínas do complexo e não por saturação de proteína. Na reação mediada pela isoforma CYP1A2, é possível observar que a presença de PGRMC1 produz um efeito inibitório, embora que ligeira, a concentrações de CYB5 inferiores para a mesma reação na ausência de PGRMC1. Ainda, na reação mediada por CYP2A6, existe um estímulo promovido pela CYB5, mas que na presença de PGRMC1 esse estímulo é menor. Por último, observa-se na atividade do CYP3A4 uma necessidade de maior quantidade de CYB5 para se obter um efeito semelhante ao registado na ausência de PGRMC1,

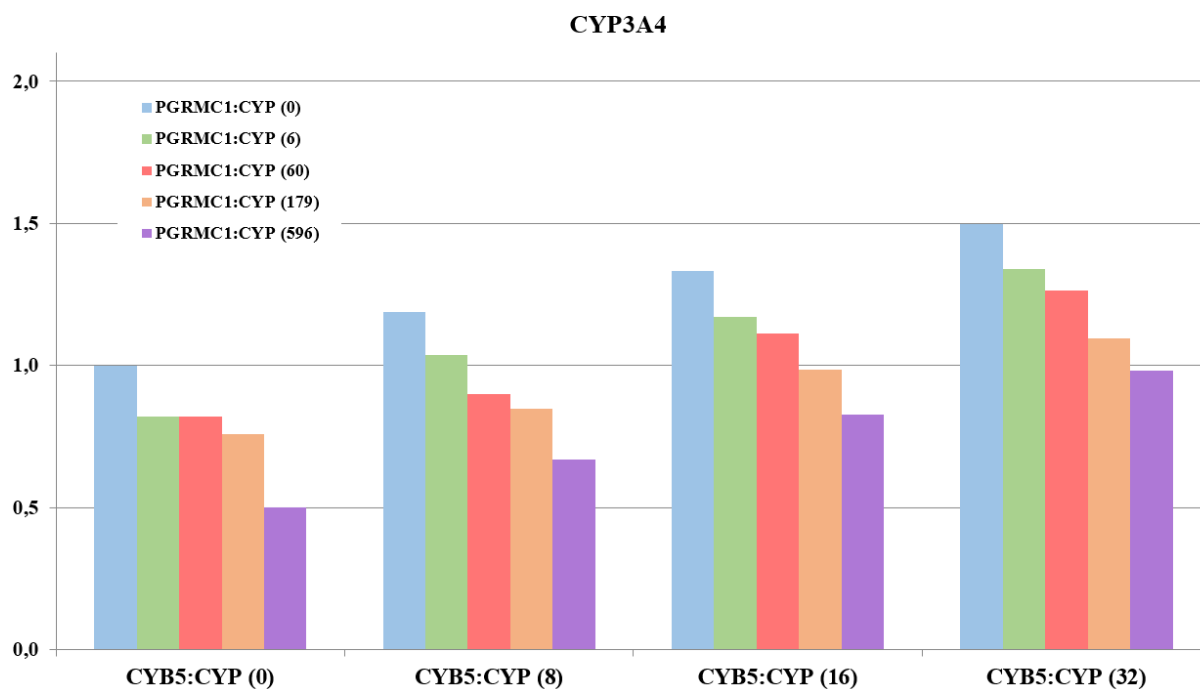
Com o objetivo de aprofundar este estudo, realizou-se um ensaio em membranas BTC-CYP, em que se variaram simultaneamente as concentrações de CYB5 e PGRMC1 (fração B3) (Figuras 3.11, 3.12 e 3.13).



**Figura 3.11:** Histograma da velocidade de reação da O-desetilação da EthR para o CYP1A2, em função da estequiometria entre PGRMC1:CYP e CYB5:CYP, para a fração membrana da estirpe BTC1A2\_PGRMC1.



**Figura 3.12:** Histograma da velocidade de reação da 7-hidroxilação da cumarina para o CYP2A6, em função da estequiometria entre PGRMC1:CYP e CYB5:CYP, para a fração membrana da estirpe BTC2A6\_PGRMC1.

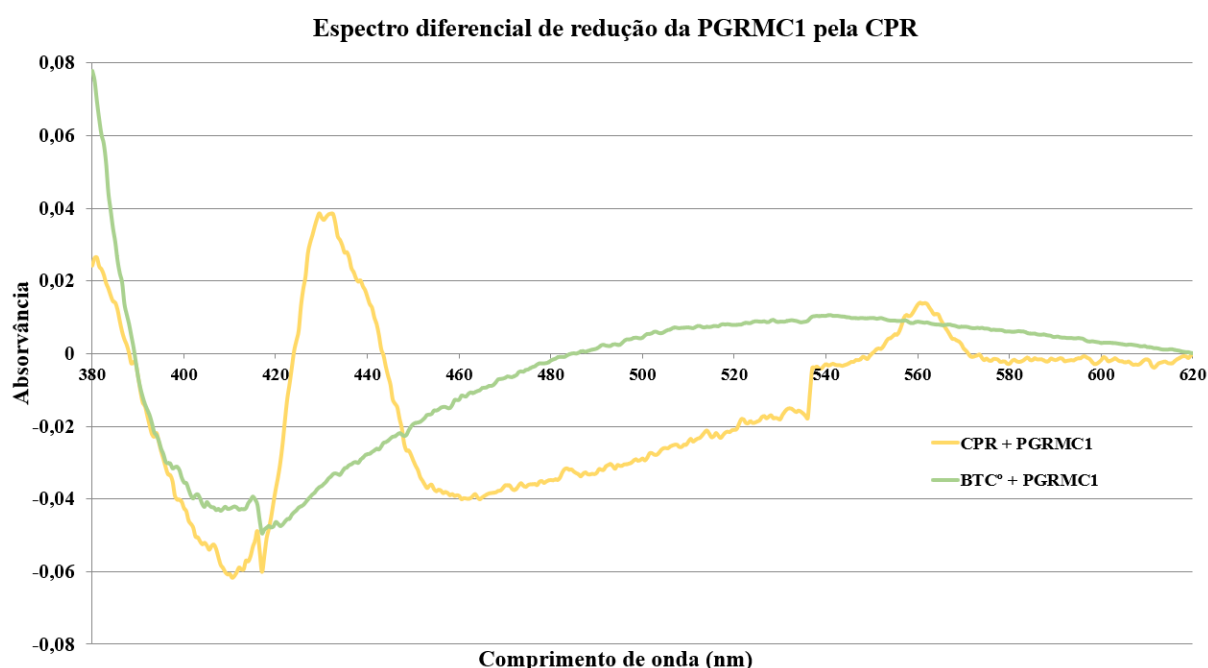


**Figura 3.13:** Histograma da velocidade de reação da O-desbenzilação da DBF para o CYP3A4, em função da estequiometria entre PGRMC1:CYP e CYB5:CYP, para a fração membrana da estirpe BTC3A4\_PGRMC1.

A partir deste ensaio, foi possível constatar que para o CYP1A2 a PGRMC1 exerce uma interferência ligeira, que conduz a uma diminuição da atividade. Na reação mediada por CYP2A6, é possível observar o efeito de estimulação do CYB5 e que a PGRMC1 praticamente não exerce nenhum efeito na velocidade de reação. Por último, na reação mediada por CYP3A4, o aumento da concentração de PGRMC1 diminui a velocidade catalítica, interferindo no estímulo do CYB5. Para além do efeito diferencial que reconhecidamente o CYB5 exerce na atividade dos diferentes CYPs (Duarte *et al.*, 2007; Henderson *et al.*, 2015, Esteves *et al.*, 2018), também a PGRMC1 parece exercer um efeito dependente da isoforma CYP com que interage.

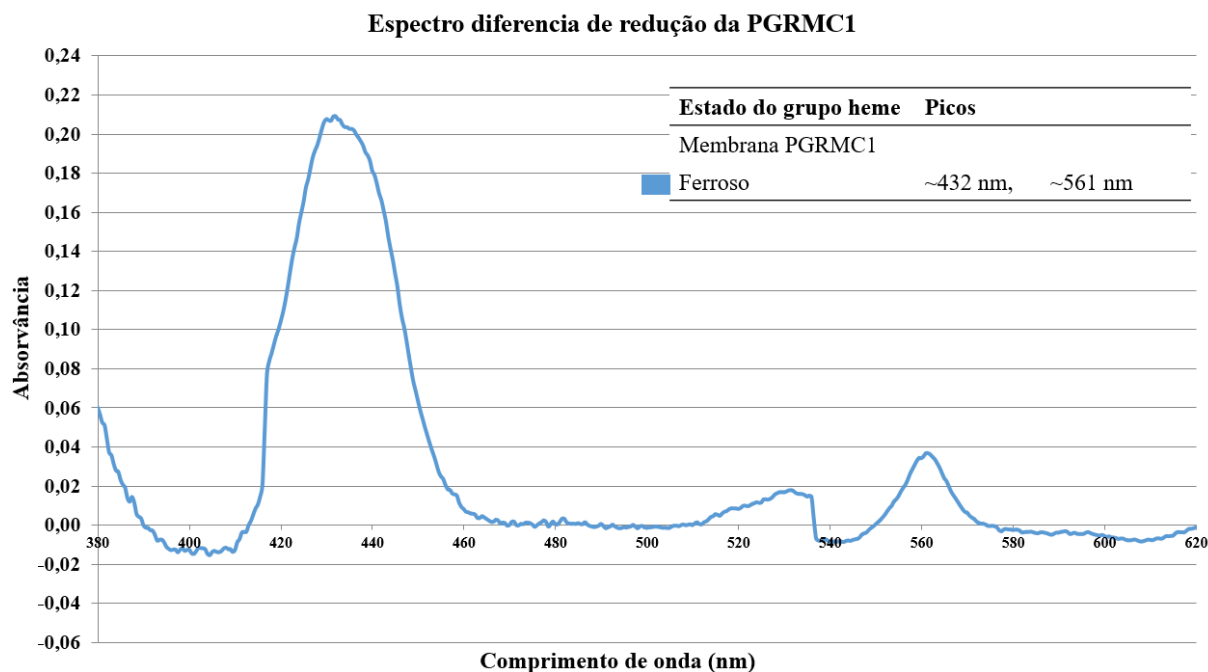
### 3.6. Ensaio de redução da PGRMC1 pela CPR

A possível interação entre a CPR e a PGRMC1 deve-se ao facto da CPR ser uma oxidoreductase envolvida em múltiplas vias metabólicas e, de certo modo, coincidir com a PGRMC1 em algumas dessas vias. Ambas as proteínas localizam-se no retículo endoplasmático, além disso, a PGRMC1 possui um grupo prostético heme, que tem uma função diferenciada conforme o seu estado de oxirredução, ou seja, estado férrico ou ferroso (Kaluka *et al.*, 2015; Kabe *et al.*, 2016). Tal como acontece com outras proteínas heme, como os CYPs ou o CYB5 (reduzidos pela CPR), a PGRMC1 tende a interagir com um parceiro redox. Para tal, fração membrana PGRMC1 foi incubada com fração membrana CPR e, com a fração membrana BTC<sup>o</sup> (controlo) (Tabela 2.1.4) (Figura 3.12).



**Figura 3.14:** Espectro diferencial PGRMC1 nos comprimentos de onda entre 380 e 620 nm, quando reduzida pela CPR.

Ainda, com o objetivo de estudar o espectro de absorvância no UV-vis da PGRMC1, reduziu-se uma fração membrana de PGRMC1 com ditionito de sódio e traçou-se o espectro diferencial (Figura 3.13), de modo a confirmar os picos máximos de absorvância.



**Figura 3.15:** Espectro diferencial de redução da PGRMC1 com ditionito de sódio (azul), nos comprimentos de onda entre 380 e 620 nm.

Tendo em conta as condições experimentais utilizadas, os resultados sugerem que a CPR tem a capacidade de reduzir a PGRMC1. É possível observar dois picos de absorvância, aproximadamente a 430 e 567 nm (Figura 3.12), após incubação da PGRMC1 com CPR. No espectro diferencial da PGRMC1 no estado ferroso é possível observar dois picos, um a 432 nm e outro a 561 nm (Figura 3.13). Estes dados vão ao encontro do reportado noutros estudos (Kaluka *et al.*, 2015; Kabe *et al.*, 2016) nos quais também se observaram dois picos no espectro da PGRMC1 no estado ferroso, a 415 e 568 nm.



## **4. DISCUSSÃO**





#### 4.1. Considerações gerais

Por muito tempo, a CPR e o CYB5 eram as únicas proteínas das quais se tinha conhecimento de interagir com os CYPs. Contudo, nos últimos anos, diversos estudos apontam a PGRMC1 como um potencial parceiro de interações dos CYPs. Estes estudos têm levantado muitas questões sobre o papel da PGRMC1 na regulação da atividade das diferentes isoformas dos CYPs e os mecanismos envolvidos nessa interação. Devido ao papel da PGRMC1 na proliferação tumoral e a sua possível implicação na resistência à quimioterapia, existe um interesse crescente em estudar o seu envolvimento e interação com o complexo CYP:CPR e também em avaliar se essas interações podem estar, de alguma forma, ligadas aos mecanismos que conduzem à quimioresistência (Crudden *et al.*, 2005.b; Cahill and Medlock, 2017). Apesar dos diversos estudos já realizados, muita da informação disponível parece escassa ou contraditória, sendo que a PGRMC1 tem sido apontada, tanto como indutor ou inibidor da atividade de CYPs. Estudos anteriores sugerem que a PGRMC1 além de interagir diretamente com o CYP, possivelmente por mecanismos semelhantes ao CYB5, também pode afetar o complexo por interação direta com a CPR (Kabe *et al.*, 2016).

Recorrendo a um modelo bacteriano biplasmídico, três isoformas CYP (CYP1A2, 2A6 e 3A4) foram combinadas separadamente com PGRMC1. O efeito da interação entre as proteínas foi avaliado através da determinação dos parâmetros cinéticos nas respectivas frações membranares. A escolha destas isoformas baseou-se no facto de que são CYPs representativos do metabolismo de fármacos e, também, o facto de alguns estudos sugerirem o envolvimento da PGRMC1 em fenómenos de quimioresistência. Este estudo incidiu sobre os mecanismos envolvidos neste fenómeno e na avaliação da interação entre a PGRMC1 e o complexo CYP. Foram usadas duas abordagens: i) a determinação de parâmetros cinéticos das isoformas CYP na presença ou ausência de PGRMC1, utilizando substratos fluorogénicos padrão; e ii) a determinação da capacidade de redução da PGRMC1 pela CPR, através de ensaios de espectrofotometria.

O uso de sistemas de co-expressão heteróloga é uma importante ferramenta para este tipo de estudos, pois permite a avaliação de mecanismos moleculares nas interações entre as enzimas do complexo CYP:CPR, como demonstrado em estudos anteriores (Moutinho *et al.*, 2012; Palma *et al.*, 2013; Campelo *et al.*, 2017; Campelo *et al.*, 2018; Esteves *et al.*, 2018). O sistema celular biplasmídico utilizado, *E. coli* BTC-CYP (Duarte *et al.*, 2005), é apropriado para efetuar a expressão heteróloga dos fatores proteicos do complexo enzimático CYP. Este sistema possibilita ainda a obtenção de razões molares CYP/CPR próximas daquelas encontradas nos microssomas do fígado humano (Paine *et al.*, 1997; Venkatakrishnan *et al.*, 2000), sendo esta razão estequiométrica um fator determinante para o estudo da atividade de um determinado CYP num dado tecido, fração celular ou sistema celular com expressão heteróloga (Kranendonk *et al.*, 2008). Os resultados obtidos no presente estudo (Tabela 3.2) apresentam estequiometrias com concentrações de PGRMC1 elevadas o que

parece sugerir que para se observar efeito da PGRMC1 na atividade do complexo enzimático CYP, esta tem que estar numa concentração relativa bastante elevada. De resto, este tipo de razões moleculares foram confirmados nos restantes ensaios, conduzidos durante o estudo.

#### 4.2. Avaliação dos resultados preliminares

O estudo inicial do efeito da PGRMC1 no complexo CYP teve como premissa a necessidade de confirmar a interferência na atividade dos CYPs pela PGRMC1 através do modelo experimental disponível BTC-CYP. Nesta primeira fase, o estudo da atividade dos CYPs em sistemas de co-expressão CYP/PGRMC1/CPR permitiu confirmar, ainda que de forma preliminar, que a PGRMC1 tem um efeito na atividade das isoformas CYP estudadas. Comparando a eficiência relativa de cada forma de CYP testada, observou-se que a presença, de PGRMC1 estimula a atividade dos CYP1A2 e 3A4 (Figura 3.1) Por outro lado, o CYP2A6 parece ser inibido pela presença da PGRMC1. A estequiometria CYP:CPR de co-expressão com PGRMC1 não se alterou de forma significativa entre cada CYP (Tabela 3.1). Este dado é relevante pois, a atividade de CYP é sensível às quantidades relativas de CPR e o aumento da atividade de CYP pode ser atribuído ao aumento dos níveis relativos de CPR. Isto poderia ser uma explicação para o aumento da eficiência de CYP, no entanto, como as estequiometrias relativas são semelhantes, a alteração da atividade dos CYPs poderá ser atribuída à presença de PGRMC1. Ainda, a atividade da isoforma CYP2A6 é reconhecidamente aumentada pela presença de CYB5, como demonstrado noutros estudos (Duarte *et al.*, 2007). No entanto, o efeito da PGRMC1 não foi semelhante ao efeito do CYB5 para esta isoforma. É de acrescentar que o CYP1A2, reconhecidamente pouco sensível à ação do CYB5 (Duarte *et al.*, 2007; Esteves *et al.*, 2018), e o CYP3A4, moderadamente sensível à presença de CYB5, demonstraram ambos um aumento acentuado (172% e 168%, respetivamente) de atividade (Henderson *et al.*, 2015). O efeito da PGRMC1 observado nestes ensaios preliminares, para além de parecer ser de natureza diferente do efeito do CYB5, também parece ser dependente da isoforma CYP em estudo.

#### 4.3. Avaliação do efeito da PGRMC1 no complexo CYP

Em primeiro lugar determinou-se o tempo de integração da PGRMC1 nas membranas BTC-CYP. Para tal, utilizou-se a fração F4, sendo que esta fração continha proteína no estado holo e apo (Figura 3.5). A análise dos resultados (Figura 3.6) permitiu verificar que 60 minutos de incubação, à temperatura ambiente, são as condições indicadas para a integração da PGRMC1 nas frações membranares. Com este resultado, ficou também evidente que esta fração estimulou (após a incubação de 60 minutos) a atividade do CYP3A4, verificando-se um claro aumento da  $k_{obs}$ , cerca de 1.45x em relação à atividade do CYP3A4 na ausência de PGRMC1. É ainda de notar que os valores utilizados de PGRMC1 nos ensaios de co-expressão iniciais para o CYP3A4 são muito semelhantes (5.3 vs 5.2  $\mu$ M), bem como as estequiometrias utilizadas em ambos os ensaios (estudos preliminares em fração membranares com: CPR:CYP3A4 – 1:2, CYP3A4:PGRMC1 – 1:211 e CPR:PGRMC1 – 1:463; e ensaio

de integração em fração membranares com: CPR:CYP3A4 – 1:2.5, CYP3A4:PGRMC1 – 1:207 e CPR:PGRMC1 – 511), validando os resultados.

O passo seguinte consistiu na verificação do efeito da PGRMC1 nas frações membranares BTC-CYP, em concentrações crescentes de proteína purificada, utilizando-se a fração B3. A análise dos resultados permitiu verificar que a atividade do CYP1A2 diminuiu conforme o aumento da concentração de PGRMC1 (Figura 3.7). Tal fenómeno foi ainda observado para o CYP3A4, de uma forma mais acentuada (Figura 3.7). Já o CYP2A6 apresentou uma ligeira estimulação em concentrações mais baixas de PGRMC1, sendo inibido em concentrações mais elevadas de PGRMC1 (Figura 3.7). A constatação destes resultados, demonstrou ser de grande interesse, pois neste ensaio, observou-se um efeito inverso ao obtido nos estudos preliminares, nos quais se verificou estimulação dos CYP1A2 e 3A4 e inibição do CYP2A6 na presença de PGRMC1. Estes resultados podem ser explicados pelo facto desta fração (B3) ser constituída maioritariamente por monómero, ou seja, tendencialmente apo-proteína, não possuindo por isso o grupo prostético heme. Estudos anteriores sugerem que a presença do grupo heme e a dimerização são necessárias para que haja interação da PGRMC1 com os CYPs (Kabe *et al.*, 2016). Sendo que a fração purificada (B3) era constituída maioritariamente por proteína no estado monomérico, poderá ter um efeito diferente ou mesmo contrário ao observado na presença de proteína dimerizada. No entanto, pode-se acrescentar que o monómero tem a capacidade de interagir, de alguma forma, com o complexo enzimático CYP, como ficou demonstrado pela diferença de atividade na presença da fração purificada B3. Com este ensaio foi possível determinar também que o efeito da PGRMC1 depende da isoforma CYP, tal como acontece com o CYB5 e em linha com os resultados das experiências preliminares. Mais ainda se pode acrescentar que a PGRMC1 poderá eventualmente ter um efeito alostérico sobre o complexo CYP, pois mesmo o monómero, forma molecular sem o grupo prostético, parece interagir com o CYP, modificando a sua atividade.

De modo a aprofundar o estudo da interação da PGRMC1 com os CYPs, foi levado a cabo um ensaio de competição entre a PGRMC1 e o CYB5, com o intuito de verificar se o local de ligação dos CYPs à PGRMC1 é coincidente com o local de ligação ao CYB5. Esta hipótese advém do facto da PGRMC1 possuir um domínio heme CYB5-like, e por isso, poder interagir com os CYPs de modo semelhante ao CYB5 e competir pela ligação ao CYP quando o CYB5 está presente. Assim, utilizaram-se frações membranares BTC CYP\_PGRMC1/CPR e CYB5 purificado em concentrações crescentes. Observou-se que na reação mediada por CYP1A2, a presença da PGRMC1 tem um efeito inibitório, embora que muito ligeiro, a concentrações de CYB5 inferiores àquilo que se observa para a mesma reação sem a presença de PGRMC1 (Figura 3.8). Na reação mediada pelo CYP2A6 (Figura 3.9), apesar de haver um estímulo promovido pelo CYB5, quando comparada à reação na ausência de PGRMC1 este estímulo foi menor, o que parece sugerir que também existe um efeito inibitório pela

competição da PGRMC1 para a ligação ao CYP. Por último, é possível observar que para a atividade do CYP3A4 (Figura 3.10), é necessária uma maior quantidade de CYB5 para que se observe um efeito semelhante aquele registado na ausência de PGRMC1. Estes dados, levam a concluir que existe uma competição da PGRMC1 com o CYB5, pois o efeito estimulante do CYB5 é menos evidente quando comparado com as reações mediadas pelas diferentes isoformas de CYP na ausência de PGRMC1. Deste modo, poderá ser sugerido que apesar de aparentemente, terem efeitos diferenciados sobre o complexo CYP, PGRMC1 e CYB5 poderão ter uma zona de interação com os CYPs semelhante ou coincidente, pelo menos em parte, o que vem ao encontro das semelhanças estruturais entre estas duas enzimas (Cahill *et al.*, 2016).

Com o objetivo de obter informações mais detalhadas acerca das interações PGRMC1:CYP, fez-se um estudo de competição entre a PGRMC1 e o CYB5, em frações membranares BTC-CYP, utilizando a fração purificada PGRMC1 (B3) e CYB5. Neste ensaio, foram aplicadas concentrações crescentes de ambas as proteínas e foi possível confirmar o efeito inibitória da PGRMC1 no efeito do CYB5, o que confirma a existência de competição entre a PGRMC1 e o CYB5 para a ligação ao CYP. Na atividade mediada pelo CYP1A2 (Figura 3.11) observou-se uma interferência da PGRMC1 que conduziu a uma diminuição da atividade. Este efeito não é muito claro, devido a esta isoforma ser pouco sensível ao CYB5 e, possivelmente também pouco sensível à PGRMC1. Através da atividade do CYP2A6 (Figura 3.12), é possível observar uma ligeira interferência da PGRMC1 no efeito estimulatório do CYB5. Sabe-se que o CYP2A6 é bastante sensível ao CYB5 (Esteves *et al.*, 2018) e, com base nos resultados do presente estudo é possível observar que a PGRMC1 tem uma menor afinidade para o CYP2A6, em relação ao CYB5. Por último, a atividade do CYP3A4 (Figura 3.13) diminuiu com o aumento da concentração da PGRMC1. O CYP3A4 tem afinidade intermédia para o CYB5 e, aparentemente estes resultados parecem indicar que também poderá ter sensibilidade intermédia para a PGRMC1.

Estudos anteriores (Hughes *et al.*, 2007; Szczesna-Skorupa and Kemper, 2010; Oda *et al.*, 2011) apontaram já para esta relação entre PGRMC1 e o CYP3A4. Szczesna-Skorupa e Kemper (2010) observaram que existe um efeito inibitório da PGRMC1 na atividade do CYP3A4 em linhas celulares HepG2 e Hek293. Por outro lado, Oda e seus colegas, reportaram um aumento na atividade do CYP3A4 em culturas celulares HepG2, quando na presença de PGRMC1. No contexto das resistências à quimioterapia, de futuro, será de todo o interesse aprofundar a interação PGRMC1:CYP3A4 de forma a clarificar o seu impacto na metabolização destes fármacos.

#### 4.4. Redução da PGRMC1 pela CPR

Estudos anteriores demonstram que a PGRMC1 tem a capacidade de se ligar ao grupo heme, mas tal ligação parece não ser tão havida como outras proteínas heme, como o CYB5. Os mecanismos envolvidos na regulação da ligação do grupo heme à PGRMC1 ainda permanecem por desvendar, mas parece que a ligação é instável, devido a esta se formar na superfície exterior da proteína e não dentro da proteína, como ocorre noutras proteínas heme. A formação de um dímero, permite que essa ligação se torne mais estável (Kabe *et al.*, 2018). Kaluka e seus colegas (2015), observaram por espectrofotometria de UV-VIS que a PGRMC1 quando no estado ferroso, apresenta dois picos de absorvância nos 416 e 567 nm (Kaluka *et al.*, 2015). Noutro estudo foram observados dois picos nos comprimentos de onda 415 e 568 nm, quando a PGRMC1 se apresenta no estado ferroso (Kabe *et al.*, 2016). Assim, numa última fase deste estudo, levantaram-se algumas questões em relação à possível interação da PGRMC1 com a CPR. Questionou-se se a CPR, uma oxidoreductase com um papel central em diversas vias metabólicas, teria a capacidade de reduzir a PGRMC1, sendo que esta proteína pode ligar-se ao grupo heme, que se apresenta no estado ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) ou férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) e, portanto, passível de ser reduzido. Deste modo, por técnicas espectrofotométricas, traçou-se um espectro diferencial de redução da PGRMC1 pela CPR (Figura 3.14), entre 380 e 620 nm. Nesse espectro foi possível observar de forma clara dois picos, um primeiro, aproximadamente a 432 nm e outro, aproximadamente a 564 nm. Ainda, no espectro diferencial da PGRMC1 no estado ferroso (reduzido com ditionito de sódio) foi possível observar dois picos, um a 432 nm e outro a 561 nm (Figura 3.15), coincidentes com o observado por Kaluka e seus colegas (2015). As diferenças entre os comprimentos de onda dos picos de absorvância obtidos neste estudo e aos observados nos estudos referidos anteriormente, parecem dever-se a diferentes metodologias, tal como o uso de proteína clipada por Kabe e seus colegas (2016), sendo que a utilizada neste ensaio é *full-length*. Assim, conforme sugerido por Szczesna-Skorupa and Kemper (2011), é possível que a PGRMC1 seja reduzida pela CPR, da mesma forma que acontece com os outros parceiros redox, como os CYPs. Esta hipótese é reforçada pela co-localização de ambas as enzimas no retículo endoplasmático (Szczesna-Skorupa and Kemper, 2011).



## **5. CONCLUSÃO**





Apesar de ser uma proteína multifuncional, as funções exatas da PGRMC1 ainda não estão suficientemente esclarecidas. No entanto, existem dados que sugerem que a PGRMC1 está envolvida no metabolismo de fármacos e que tem a capacidade de interagir com o complexo enzimático CYP. Ainda, estudos indicam que existe sobre expressão desta proteína em múltiplos tipos de cancro, como cancro da tiroide, ovário, mamário ou pulmão e, está implicada no crescimento tumoral, na diferenciação celular em tumores, metastização, e no fenómeno de quimioresistência. Por estes motivos, existe um grande interesse clínico associado aos mecanismos em que a PGRMC1 está envolvida. Assim, esta dissertação teve como objetivo avaliar a interação entre a PGRMC1 e o complexo CYP e o seu impacto no metabolismo mediado por CYP, mais precisamente no metabolismo de fármacos e, quais as potenciais implicações desta interação na quimioresistência. Deste modo, utilizou-se um modelo de expressão heteróloga que permitiu a co-expressão de CPR e PGRMC1, com as diferentes isoformas CYP (CYP1A2, 2A6 e 3A4), representativas do metabolismo de fármacos, e como tal envolvidas na metabolização de fármacos utilizados na terapia contra o cancro.

As alterações na expressão de PGRMC1 em certas condições fisiológicas podem afetar, de forma ainda pouco clara, o metabolismo mediado por CYP, tendo impacto na metabolização de quimioterapêuticos. Este estudo, veio suportar a hipótese de que a PGRMC1 tem a capacidade de interagir com o complexo enzimático CYP e clarificar pelo menos em parte, os mecanismos envolvidos nessa interação. Através deste estudo, foi possível observar que existe interação entre a PGRMC1 e o complexo enzimático CYP e que o efeito dessa interação depende não só da isoforma CYP, mas também do estado conformacional da PGRMC1 (dímero ou monómero) e, consequentemente, da presença do grupo prostético heme. Ainda, foi possível verificar que existe competição entre a PGRMC1 e o CYB5, possivelmente pelo mesmo local de ligação aos CYPs, sendo que a PGRMC1 altera o efeito estimulatório do CYB5 na atividade dos CYPs estudados, causando um efeito inibitório por competição. Assim, pode sugerir-se que as interações CYP:PGRMC1 e CYP:CYB5, ocorrem através de uma região de ligação dos CYPs coincidente. É de referir que a possibilidade da PGRMC1 interferir com a ação da CPR no contexto do complexo CYP, e mesmo de poder ser reduzida por esta oxirredutase, não pode ser excluída deste “puzzle metabólico”, tal como demonstrado no presente estudo.

Assim, através deste estudo, foi também possível observar que as quantidades relativas de PGRMC1 apresentadas são elevadas em relação aos CYPs em estudo, sugerindo que é necessária uma grande quantidade relativa de PGRMC1 para que se observe um efeito na atividade enzimática de CYP. Esta informação está de acordo com o reportado por outros estudos, em que se observa uma sobre expressão da PGRMC1 em diversos cancros, sugerindo que esta interação, ao aumentar a atividade catalítica dos CYPs, leva a uma aceleração metabolização dos fármacos, provocando

ineficiência terapêutica. Apesar das hipóteses levantadas neste estudo, muitas questões necessitam ainda de resposta e estudos no sentido de tentar compreender o envolvimento global da PGRMC1 na resistência à quimioterapia, são necessários.

## **6. BIBLIOGRAFIA**



- Ames, B., Lee, F., & Durston, W. (1973). An Improved Bacterial Test System for the Detection and Classification of Mutagens and Carcinogens. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 70(3), 782-786. doi: 10.1073/pnas.70.3.782
- Anzenbacher, P., & Anzenbacherová, E. (2001). Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics: *Cellular and Molecular Life Sciences*, 58(5), 737-747. <https://doi.org/10.1007/PL00000897>
- Bart, A. G., & Scott, E. E. (2017). Structural and functional effects of cytochrome *b*<sub>5</sub> interactions with human cytochrome P450 enzymes. *Journal of Biological Chemistry*, 292(51), 20818-20833. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA117.000220>
- Bastide, N. M., Pierre, F. H. F., & Corpet, D. E. (2011). Heme Iron from Meat and Risk of Colorectal Cancer: A Meta-analysis and a Review of the Mechanisms Involved. *Cancer Prevention Research*, 4(2), 177-184. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-10-0113>
- Bhatt, M. R., Khatri, Y., Rodgers, R. J., & Martin, L. L. (2017). Role of cytochrome b5 in the modulation of the enzymatic activities of cytochrome P450 17 $\alpha$ -hydroxylase/17,20-lyase (P450 17A1). *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 170, 2-18. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2016.02.033>
- Bibi, Z. (2008). Role of cytochrome P450 in drug interactions. *Nutrition & Metabolism*, 5(1), 27. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-5-27>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Cahill, M. A. (2007). Progesterone receptor membrane component 1: An integrative review. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 105(1-5), 16-36. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2007.02.002>
- Cahill, M., & Medlock, A. (2017). Thoughts on interactions between PGRMC1 and diverse attested and potential hydrophobic ligands. *The Journal Of Steroid Biochemistry And Molecular Biology*, 171, 11-33. doi: 10.1016/j.jsbmb.2016.12.020
- Cahill, M. A., Jazayeri, J. A., Catalano, S. M., Toyokuni, S., Kovacevic, Z., & Richardson, D. R. (2016). The emerging role of progesterone receptor membrane component 1 (PGRMC1) in cancer biology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1866(2), 339-349. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2016.07.004>
- Campelo, D., Esteves, F., Palma, B., Gomes, B., Rueff, J., Lautier, T., Urban, P., Truan, G., & Kranendonk, M. (2018). Probing the Role of the Hinge Segment of Cytochrome P450 Oxidoreductase in the Interaction with Cytochrome P450. *International Journal Of Molecular Sciences*, 19(12), 3914. doi: 10.3390/ijms19123914
- Campelo, D., Lautier, T., Urban, P., Esteves, F., Bozonnet, S., Truan, G., & Kranendonk, M. (2017). The Hinge Segment of Human NADPH-Cytochrome P450 Reductase in Conformational Switching: The Critical Role of Ionic Strength. *Frontiers in Pharmacology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00755>
- Crudden, G. (2005.a). Hpr6 (Heme-1 Domain Protein) Regulates the Susceptibility of Cancer Cells to Chemotherapeutic Drugs. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 316(1), 448-455. <https://doi.org/10.1124/jpet.105.094631>

- Crudden, Gerard, Loesel, R., & Craven, R. J. (2005.b). Overexpression of the Cytochrome P450 Activator Hpr6 (Heme-1 Domain Protein/Human Progesterone Receptor) in Tumors. *Tumor Biology*, 26(3), 142–146. <https://doi.org/10.1159/000086485>
- Duarte, M. P., Palma, B. B., Laires, A., Oliveira, J. S., Rueff, J., & Kranendonk, M. (2005). Escherichia coli BTC, a human cytochrome P450 competent tester strain with a high sensitivity towards alkylating agents: Involvement of alkyltransferases in the repair of DNA damage induced by aromatic amines. *Mutagenesis*, 20(3), 199–208. doi:10.1093/mutage/gei028
- Duarte, M. P., Palma, B. B., Gilep, A. A., Laires, A., Oliveira, J. S., Usanov, S. A., Rueff, J., Kranendonk, M. (2007). The stimulatory role of human cytochrome b5 in the bioactivation activities of human CYP1A2, 2A6 and 2E1: A new cell expression system to study cytochrome P450-mediated biotransformation (a corrigendum report on Duarte et al. (2005) *Mutagenesis* 20, 93-100). *Mutagenesis*, 22(1), 75-81. doi:10.1093/mutage/gel054
- Dürr, U. H. N., Yamamoto, K., Im, S.-C., Waskell, L., & Ramamoorthy, A. (2007). Solid-State NMR Reveals Structural and Dynamical Properties of a Membrane-Anchored Electron-Carrier Protein, Cytochrome *b*<sub>5</sub>. *Journal of the American Chemical Society*, 129(21), 6670–6671. <https://doi.org/10.1021/ja069028m>
- Ellis, J., Gutierrez, A., Barsukov, I. L., Huang, W.-C., Grossmann, J. G., & Roberts, G. C. K. (2009). Domain Motion in Cytochrome P450 Reductase: CONFORMATIONAL EQUILIBRIA REVEALED BY NMR AND SMALL-ANGLE X-RAY SCATTERING. *Journal of Biological Chemistry*, 284(52), 36628–36637. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.054304>
- Esteves, F., Campelo, D., Urban, P., Bozonnet, S., Lautier, T., Rueff, J., Truan, G., Kranendonk, M. (2018). Human cytochrome P450 expression in bacteria: Whole-cell high-throughput activity assay for CYP1A2, 2A6 and 3A4. *Biochemical Pharmacology*, 158, 134–140. doi:10.1016/j.bcp.2018.10.006
- Falkenstein, E., Eisen, C., Schmieding, K., Stein, C., Lösel, R., & Wehling, M. (2001). Chemical modification and structural analysis of the progesterone membrane binding protein from porcine liver membranes, 10.
- Fisher, C. W., Caudle, D. L., Martin-Wixtrom, C., Quattrochi, L. C., Tukey, R. H., Waterman, M. R., & Estabrook, R. W. (1992). High-level expression of functional human cytochrome P450 1A2 in Escherichia coli. *The FASEB Journal*, 6(2), 759–764. <https://doi.org/10.1096/fasebj.6.2.1537466>
- Gerdes, D., Wehling, M., Leube, B., & Falkenstein, E. (1998). Cloning and Tissue Expression of Two Putative Steroid Membrane Receptors, *Biological Chemistry*, 379, 907–911.
- Guengerich, F.P. (2005) Chapter 10 in: Montellano, P.R.O., *Cytochrome P450 Structure, Mechanism, and Biochemistry*. 3ª Edição, Kluwer Academic e Plenum Publishers, New York, EUA. 386–399.
- Guengerich, F.P. (2015) Human cytochrome P450 enzymes. In *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry* (4th edn) (Ortiz de Montellano, P.R., ed.), pp. 523–785, Springer

- Guengerich, F. P. (2007). Mechanisms of cytochrome P450 substrate oxidation: MiniReview. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 21(4), 163–168. <https://doi.org/10.1002/jbt.20174>
- Guengerich, F. P., Waterman, M. R., & Egli, M. (2016). Recent Structural Insights into Cytochrome P450 Function. *Trends in Pharmacological Sciences*, 37(8), 625–640. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2016.05.006>
- Hampton, K. K., Stewart, R., Napier, D., Claudio, P. P., & Craven, R. J. (2015). PGRMC1 Elevation in Multiple Cancers and Essential Role in Stem Cell Survival. *Advances in Lung Cancer*, 04(03), 37–51. <https://doi.org/10.4236/alc.2015.43006>
- Hand, R. A., Jia, N., Bard, M., & Craven, R. J. (2003). *Saccharomyces cerevisiae* Dap1p, a Novel DNA Damage Response Protein Related to the Mammalian Membrane-Associated Progesterone Receptor. *Eukaryotic Cell*, 2(2), 306–317. <https://doi.org/10.1128/EC.2.2.306-317.2003>
- Henderson, C., McLaughlin, L., Scheer, N., Stanley, L., & Wolf, C. (2015). Cytochrome b5 Is a Major Determinant of Human Cytochrome P450 CYP2D6 and CYP3A4 Activity In Vivo. *Molecular Pharmacology*, 87(4), 733–739. doi: 10.1124/mol.114.097394
- Hildebrandt, A., & Estabrook, R. (1971). Evidence for the participation of cytochrome b5 in hepatic microsomal mixed-function oxidation reactions. *Archives Of Biochemistry And Biophysics*, 143(1), 66–79. doi: 10.1016/0003-9861(71)90186-x
- Horecker, B. L., & Heppel, A. (1949). THE REDUCTION OF CYTOCHROME c BY XANTHINE OXIDASE, 9.
- Hughes, A. L., Powell, D. W., Bard, M., Eckstein, J., Barbuch, R., Link, A. J., & Espenshade, P. J. (2007). Dap1/PGRMC1 Binds and Regulates Cytochrome P450 Enzymes. *Cell Metabolism*, 5(2), 143–149. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.12.009>
- Ingelman-Sundberg, M. (2001). Genetic variability in susceptibility and response to toxicants. *Toxicology Letters*, 120(1-3), 259–268. doi:10.1016/s0378-4274(01)00278-8
- Iyanagi, T., Xia, C., & Kim, J.-J. P. (2012). NADPH–cytochrome P450 oxidoreductase: Prototypic member of the diflavin reductase family. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 528(1), 72–89. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2012.09.002>
- Jancova, P., Anzenbacher, P., & Anzenbacherova, E. (2010). PHASE II DRUG METABOLIZING ENZYMES. *Biomedical Papers*, 154(2), 103–116. <https://doi.org/10.5507/bp.2010.017>
- Kabe, Y., Nakane, T., Koike, I., Yamamoto, T., Sugiura, Y., Harada, E., ... Suematsu, M. (2016). Haem-dependent dimerization of PGRMC1/Sigma-2 receptor facilitates cancer proliferation and chemoresistance. *Nature Communications*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/ncomms11030>
- Kabe, Y., Handa, H., & Suematsu, M. (2018). Function and structural regulation of the carbon monoxide (CO)-responsive membrane protein PGRMC1. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 63(1), 12–17. doi:10.3164/jcbrn.17-132
- Kaluka, D., Batabyal, D., Chiang, B.-Y., Poulos, T. L., & Yeh, S.-R. (2015). Spectroscopic and Mutagenesis Studies of Human PGRMC1. *Biochemistry*, 54(8), 1638–1647. <https://doi.org/10.1021/bi501177e>

- Kranendonk, M., Mesquita, P., Laires, A., Vermeulen, N. P. E., & Rueff, J. (1998). Expression of human cytochrome P450 1A2 in *Escherichia coli*: a system for biotransformation and genotoxicity studies of chemical carcinogens. *Mutagenesis*, 13(3), 263–269. <https://doi.org/10.1093/mutage/13.3.263>
- Kranendonk, Michel, Fisher, C. W., Roda, R., Carreira, F., Theisen, P., Laires, A., Rueff, J., Vermeulen, N.P.E., Estabrook, R. W. (1999). *Escherichia coli* MTC, a NADPH cytochrome P450 reductase competent mutagenicity tester strain for the expression of human cytochrome P450: Comparison of three types of expression systems. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 439(2), 287–300. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(98\)00193-4](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(98)00193-4)
- Kranendonk, Michel, Marohnic, C. C., Panda, S. P., Duarte, M. P., Oliveira, J. S., Masters, B. S. S., & Rueff, J. (2008). Impairment of human CYP1A2-mediated xenobiotic metabolism by Antley–Bixler syndrome variants of cytochrome P450 oxidoreductase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 475(2), 93–99. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2008.04.014>
- Lin, S.-T., May, E. W. S., Chang, J.-F., Hu, R.-Y., Wang, L. H.-C., & Chan, H.-L. (2015). PGRMC1 contributes to doxorubicin-induced chemoresistance in MES-SA uterine sarcoma. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72(12), 2395–2409. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1831-9>
- Mallory, J. C., Crudden, G., Johnson, B. L., Mo, C., Pierson, C. A., Bard, M., & Craven, R. J. (2005). Dap1p, a Heme-Binding Protein That Regulates the Cytochrome P450 Protein Erg11p/Cyp51p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 25(5), 1669–1679. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.5.1669-1679.2005>
- Meyer, C., Schmid, R., Scriba, P. C., & Wehling, M. (1996). Purification and Partial Sequencing of High-Affinity Progesterone-Binding Site(s) from Porcine Liver Membranes. *European Journal of Biochemistry*, 239(3), 726–731. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1996.0726u.x>
- Mifsud, W., & Bateman, A. (2002). Membrane-bound progesterone receptors contain a cytochrome b5-like ligand-binding domain. *Genome biology*, 3(12), RESEARCH0068.
- Moutinho, D., Marohnic, C. C., Panda, S. P., Rueff, J., Masters, B. S., & Kranendonk, M. (2012). Altered Human CYP3A4 Activity Caused by Antley-Bixler Syndrome-Related Variants of NADPH-Cytochrome P450 Oxidoreductase Measured in a Robust In Vitro System. *Drug Metabolism and Disposition*, 40(4), 754–760. <https://doi.org/10.1124/dmd.111.042820>
- Nebert, D. W., Wikvall, K., & Miller, W. L. (2013). Human cytochromes P450 in health and disease. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 368(1612), 20120431–20120431. <https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0431>
- Nebert, D. W., Adesnik, M., Coon, M. J., Estabrook, R. W., Gonzalez, F. J., Guengerich, F. P., . . . Waterman, M. R. (1987). The P450 Gene Superfamily: Recommended Nomenclature. *Dna*, 6(1), 1–11. doi:10.1089/dna.1987.6.1
- Nelson, D. R., Koymans, L., Kamataki, T., Stegeman, J. J., Feyereisen, R., Waxman, D. J., . . . Nebert, D. W. (1996). P450 superfamily: Update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics*, 6(1), 1–42. doi:10.1097/00008571-199602000-00002
- Oda, S., Nakajima, M., Toyoda, Y., Fukami, T., & Yokoi, T. (2011). Progesterone Receptor Membrane Component 1 Modulates Human Cytochrome P450 Activities in an Isoform-Dependent Manner. *Drug Metabolism and Disposition*, 39(11), 2057–2065.



- <https://doi.org/10.1124/dmd.111.040907>
- Omura, T. & Sato, R. (1964) - The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. *The Journal of Biological Biochemistry*, 239, 7.
- Omura, T. (2010). Structural diversity of cytochrome P450 enzyme system. *The Journal of Biochemistry*, 147(3), 297–306. <https://doi.org/10.1093/jb/mvq001>
- Paine, M. F., Khalighi, M., Fisher, J. M., Shen, D. D., Kunze, K. L., Marsh, C. L., Perkins, J.M., Thummel, K. E. (1997). Characterization of Interintestinal and Intraintestinal Variations in Human CYP3A-Dependent Metabolism, 283, 11.
- Palma, B. B., Silva e Sousa, M., Urban, P., Rueff, J., & Kranendonk, M. (2013). Functional characterization of eight human CYP1A2 variants: the role of cytochrome b5. *Pharmacogenetics and Genomics*, 23(2), 41–52. <https://doi.org/10.1097/FPC.0b013e32835c2ddf>
- Pandey, A. V., & Flück, C. E. (2013). NADPH P450 oxidoreductase: Structure, function, and pathology of diseases. *Pharmacology & Therapeutics*, 138(2), 229–254. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.01.010>
- Pandey, A. V., & Sproll, P. (2014). Pharmacogenomics of human P450 oxidoreductase. *Frontiers in Pharmacology*, 5. <https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00103>
- Parkinson, A.; 2001, New York, McGraw-Hill, Toxicology- The basic Science of Poisons, Chapter 6: Biotransformation of xenobiotics, p. 133–137
- Parkinson, A. 2008. Biotransformation of xenobiotics. Casarett and Doull's Toxicology: The basic science of poisons. Curtis D. Klaassen. Kansas, McGraw-Hill: 161-304.
- Peluso, John J., Pappalardo, A., Losel, R., & Wehling, M. (2005). Expression and Function of PAIRBP1 Within Gonadotropin-Primed Immature Rat Ovaries: PAIRBP1 Regulation of Granulosa and Luteal Cell Viability1. *Biology of Reproduction*, 73(2), 261–270. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.105.041061>
- Porter, T. D. (2002). The roles of cytochrome b5 in cytochrome P450 reactions. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 16(6), 311–316. <https://doi.org/10.1002/jbt.10052>
- Raza, F. S., Takemori, H., Tojo, H., Okamoto, M., & Vinson, G. P. (2001). Identification of the rat adrenal zona fasciculata/reticularis specific protein, inner zone antigen (IZAg), as the putative membrane progesterone receptor: IZAg is the putative membrane progesterone receptor. *European Journal of Biochemistry*, 268(7), 2141–2147. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2001.02096.x>
- Rohe, H. J., Ahmed, I. S., Twist, K. E., & Craven, R. J. (2009). PGRMC1 (progesterone receptor membrane component 1): A targetable protein with multiple functions in steroid signaling, P450 activation and drug binding. *Pharmacology & Therapeutics*, 121(1), 14–19. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2008.09.006>
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Selmin, O., Lucier, G., Clark, G., Tritscher, A., Vandenheuvel, J., Gastel, J., Walker, J.W., Sutter, T.R., Bell, A. (1997). Isolation and characterization of a novel gene induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in rat liver. *Hepatology Research*, 7(1), 73-73.

- doi:10.1016/s0928-4346(97)89848-9
- Storbeck, K.-H., Swart, A. C., Goosen, P., & Swart, P. (2013). Cytochrome b5: Novel roles in steroidogenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 371(1–2), 87–99. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2012.11.020>
- Strittmatter, C. F., & Ball, E. G. (1952). A Hemochromogen Component of Liver Microsomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 38(1), 19–25.
- Szczesna-Skorupa, E., & Kemper, B. (2011). Progesterone Receptor Membrane Component 1 Inhibits the Activity of Drug-Metabolizing Cytochromes P450 and Binds to Cytochrome P450 Reductase. *Molecular Pharmacology*, 79(3), 340–350. <https://doi.org/10.1124/mol.110.068478>
- Timbrell, J. A., & Marrs, T. C. (2009). Biotransformation of Xenobiotics. Em B. Ballantyne, T. C. Marrs, & T. Syversen (Eds.), *General and Applied Toxicology*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470744307.gat004>
- Vivekanandan, S., Ahuja, S., Im, S.-C., Waskell, L., & Ramamoorthy, A. (2014). <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N resonance assignments for the full-length mammalian cytochrome b5 in a membrane environment. *Biomolecular NMR Assignments*, 8(2), 409–413. <https://doi.org/10.1007/s12104-013-9528-9>
- Xu, J., Zeng, C., Chu, W., Pan, F., Rothfuss, J. M., Zhang, F., ... Mach, R. H. (2011). Identification of the PGRMC1 protein complex as the putative sigma-2 receptor binding site. *Nature Communications*, 2(1). <https://doi.org/10.1038/ncomms1386>
- Yamamoto, T., Takano, N., Ishiwata, K., Ohmura, M., Nagahata, Y., Matsuura, T., ... Suematsu, M. (2014). Reduced methylation of PFKFB3 in cancer cells shunts glucose towards the pentose phosphate pathway. *Nature Communications*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/ncomms4480>
- Zanger, U. M., Turpeinen, M., Klein, K., & Schwab, M. (2008). Functional pharmacogenetics/genomics of human cytochromes P450 involved in drug biotransformation. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 392(6), 1093–1108. <https://doi.org/10.1007/s00216-008-2291-6>
- Zhang, Haifeng, Gao, N., Liu, T., Fang, Y., Qi, B., Wen, Q., ... Qiao, H. (2015). Effect of Cytochrome b5 Content on the Activity of Polymorphic CYP1A2, 2B6, and 2E1 in Human Liver Microsomes. *PLOS ONE*, 10(6), e0128547. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128547>
- Zhang, Haoming, Im, S.-C., & Waskell, L. (2007). Cytochrome b<sub>5</sub> Increases the Rate of Product Formation by Cytochrome P450 2B4 and Competes with Cytochrome P450 Reductase for a Binding Site on Cytochrome P450 2B4. *Journal of Biological Chemistry*, 282(41), 29766–29776. <https://doi.org/10.1074/jbc.M703845200>

**ANEXOS**



## **Anexo 1**





**Figura 1:** *Pellet* da fração membrana PGRMC1 após primeira ultracentrifugação